



Sofia Silva Brites

**O Ensino da Biotecnologia e Microbiologia no 12º
ano: procedimentos experimentais**



Sofia Silva Brites

**O Ensino da Biotecnologia e Microbiologia no 12º
ano: procedimentos experimentais**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ensino de Geologia e Biologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Sónia Mendo, Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação da Doutora Conceição dos Santos, Professora associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo incansável apoio.

o júri

Presidente

Prof. Doutor Fernando José Mendes Gonçalves
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos
Professora Associado da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Paula Bacelar Valente da Costa Nicolau
Professora Auxiliar da Universidade Aberta

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

A todos os que tornaram possível a concretização deste meu projecto, os meus sinceros agradecimentos pela ajuda, apoio e amizade.

À Professora Doutora Sónia Mendo e à Professora Doutora Conceição dos Santos, pela orientação, disponibilidade e incentivo. Agradeço a ambas pela confiança depositada neste trabalho e todos os ensinamentos. Agradeço também todas as críticas e sugestões ao longo de todo o trabalho.

A todos os que trabalham no laboratório de Biotecnologia Vegetal do departamento de Biologia pela simpatia e disponibilidade sempre prestadas, de forma especial à Professora Ana Gabriel pelo apoio e parceria na actividade de “Detecção da produção de antibióticos por microrganismos do solo”, pelo companheirismo e simpatia. E à Professora Doutora Tina Lopes pela disponibilidade prestada na distribuição dos questionários, o meu sincero agradecimento.

Ao técnico Armando Lopes pela ajuda e disponibilidade na construção do biorreactor.

A todos os que trabalham no laboratório de Biotecnologia Microbiana do departamento de Biologia pelo apoio e simpatia sempre demonstrados.

A todas as escolas secundárias e todos os professores que gentilmente colaboraram neste estudo.

Aos meus pais e irmãos pela força, coragem e apoio sempre prestado, à Mariana pela paciência que teve durante a minha ausência.

Ao João pela boa disposição contagiante, pelo apoio e paciência que me dispensou.

E a todos aqueles cujo nome não referi mas que me dispensaram a sua atenção e ajuda. Muito obrigada.

palavras-chave

Biotecnologia, Ensino das Ciências, Microbiologia, Procedimentos experimentais, Trabalho Prático.

resumo

Actualmente, é imperativo um ensino das Ciências orientado para a sociedade, para tal, centrado no indivíduo e que contribua para a formação de cidadãos informados e participativos que possam assumir responsabilidades pelas suas decisões face à resolução de problemas científicos e tecnológicos.

As áreas de aplicação da Biotecnologia e da Microbiologia são muito variadas e delas surge a importância e o impacto que estas Ciências têm.

O ensino da Biotecnologia e da Microbiologia, na disciplina de Biologia do 12º ano de escolaridade, promove o interesse dos alunos e motiva-os para o estudo da Biologia, dado que estas áreas abordam temas da actualidade. No entanto, por serem áreas em desenvolvimento, torna-se difícil adoptar metodologias adequadas para o seu ensino.

A presente investigação pretende dar uma visão inovadora no que se refere à implementação no ensino secundário de actividades laboratoriais na área da Biotecnologia e da Microbiologia. Deste modo, efectuou-se uma recolha e análise de opiniões dos professores do 11º grupo B, Biologia e Geologia, acerca do ensino das Ciências e da aplicabilidade do Trabalho Prático no processo de ensino-aprendizagem.

Considerando os objectivos e princípios orientadores do actual programa da disciplina de Biologia do 12º ano, procedeu-se à concepção, construção e optimização de procedimentos experimentais para o ensino da Biotecnologia, tendo em conta a realidade das escolas portuguesas, a nível da disponibilidade de material e de tempos lectivos. A escolha dos procedimentos experimentais foi direccionada de forma a privilegiar actividades que favorecem: o estudo de situações-problema com interesse para os alunos num contexto Ciência, Tecnologia e Sociedade (CTS); a explicitação e discussão das ideias dos alunos, face às situações colocadas; a argumentação e a reflexão sobre possíveis modelos explicativos; e o desenvolvimento de valores e atitudes de responsabilização pessoal e social. No final é apresentado um *Guia do Professor*, que se pretende que seja um material de apoio enriquecedor das práticas pedagógicas dos professores de Biologia.

Keywords

Biotechnology, Education of Science, Experimental procedures, Microbiology, Practical Work.

Abstract

Presently, Science education should be guided for the society, thus, focused in the individual, contributing to the formation of informed and participant citizens who can assume responsibilities in the resolution of scientific and technological problems.

The importance and impact that Biotechnology and Microbiology have nowadays is due to their wide areas of application.

Teaching Biotechnology and Microbiology, in the school discipline of Biology in the 12th grade, promotes the interest of the students and motivates them towards the study of Biology, given that these areas approach current subjects. However, due to their quick development, it becomes increasingly difficult to adopt methodologies adjusted to teaching them.

This study aimed mostly to give an innovative vision for the implementation of laboratorial activities in the areas of Biotechnology and Microbiology in high school. In this manner, opinions from teachers of the 11th group B, Biology and Geology, concerning the teaching of Sciences and the applicability of the Practical Work in the teaching-learning process, were gathered and analysed. Considering the objectives and guiding principles of the current program of Biology for the 12th grade, experimental procedures for the teaching of Biotechnology were conceptualized, created and optimized, taking into account the reality of the Portuguese schools, regarding material and time availability. Experimental procedures were selected favouring the activities that promoted: the study of problem-situations, with interest for the students in a Science, Technology and Society (STS) context; the exposure and discussion of students ideas towards the situations presented; the argumentation and reflection on possible clarifying models; and the development of values and attitudes of personal and social responsibility. In the end, a Teacher's Guide is presented, which intends to be a supporting material that enriches Biology teaching practices.

Índice

CAPÍTULO I - PROBLEMÁTICA EM ESTUDO	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS: A IMPORTÂNCIA DA LITERACIA CIENTÍFICA	14
3. O ENSINO DAS CIÊNCIAS NO CONTEXTO CTS	15
4. O PROCESSO DE ENSINO/APRENDIZAGEM NAS DISCIPLINAS DE BIOLOGIA NO ENSINO SECUNDÁRIO	16
5. METODOLOGIAS DE ENSINO DAS CIÊNCIAS	17
5.1. <i>A importância de Trabalho Prático no ensino das Ciências</i>	17
5.2. <i>O Trabalho Prático no ensino da Biologia</i>	19
6. O PROBLEMA DA INVESTIGAÇÃO	20
6.1. <i>Questões e objectivos da investigação</i>	21
6.2. <i>Organização do estudo</i>	21
CAPÍTULO II - METODOLOGIA DA INVESTIGAÇÃO	23
1. INTRODUÇÃO	24
2. DESCRIÇÃO DO ESTUDO	24
3. POPULAÇÃO E AMOSTRA	24
3.1. <i>Caracterização das amostras</i>	25
3.2. <i>Seleção das técnicas de investigação</i>	26
4. ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DO QUESTIONÁRIO	28
4.1. <i>Elaboração do questionário</i>	28
4.2. <i>Validação do questionário</i>	30
5. RECOLHA DE DADOS	31
6. TRATAMENTO DOS DADOS	31
CAPÍTULO III - REVISÃO DA LITERATURA	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. BIOTECNOLOGIA E AS SUAS APLICAÇÕES	34
3. BIOTECNOLOGIA MICROBIANA: OS MICRORGANISMOS E A SUA IMPORTÂNCIA	36
3.1. <i>Microrganismos com interesse industrial</i>	36
3.2. <i>Características biológicas do microrganismo</i>	37
3.3. <i>Alterações do material genético: Mutações</i>	53
3.4. <i>Mecanismos de reparação genética</i>	57
3.5. <i>Biotechnology na terapêutica de doenças: Produção de antibióticos</i>	59
3.6. <i>Microrganismos e a indústria: actividade enzimática</i>	68
3.7. <i>Etapas de um processo industrial de Biotecnologia Microbiana</i>	75
3.8. <i>Biorreactores</i>	81
CAPÍTULO IV - APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS QUESTIONÁRIOS	85
1. INTRODUÇÃO	86
2. DESCRIÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS	87
2.1. <i>Resultados do Questionário de Opiniões</i>	87
CAPÍTULO V - ACTIVIDADES LABORATORIAIS	110
1. INTRODUÇÃO	111
2. ENQUADRAMENTO DAS ACTIVIDADES NO PROGRAMA NACIONAL DE BIOLOGIA DO 12º ANO	112
3. MATERIAL E MÉTODOS	114
3.1. <i>Deteção da produção de antibióticos por microrganismos do solo</i>	115
3.2. <i>Deteção da produção de enzimas extracelulares por microrganismos do solo</i>	119
3.3. <i>Determinação do efeito mutagénico da luz ultravioleta na produção de metabolitos por microrganismos do solo;</i>	120

3.4. Produção em pequena escala de metabolitos microbianos num biorreactor	125
3.5. Aplicação das enzimas produzidas em Microbiologia industrial.....	128
3.6. Orçamento do material, reagentes e equipamentos.....	131
4. APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS	133
4.1. Caracterização da amostra de solo	134
4.2. Detecção da produção de antibióticos por microrganismos do solo	134
4.3. Actividade enzimática extracelular.....	136
4.4. Determinação do efeito mutagénico da luz UV – selecção de mutantes.....	138
4.5. Produção de metabolitos num biorreactor	146
4.6. Determinação da actividade enzimática de detergentes domésticos	150
5. AS ACTIVIDADES EXPERIMENTAIS NA SALA DE AULA.....	150
CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO GERAL E SUGESTÕES EDUCACIONAIS	152
1. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DO QUESTIONÁRIO DE OPINIÕES	153
2. DISCUSSÃO E AVALIAÇÃO CRÍTICA DO GRAU DE EXEQUIBILIDADE DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS NAS ESCOLAS SECUNDÁRIAS	158
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES EDUCACIONAIS.....	159
PERSPECTIVAS FUTURAS	162
BIBLIOGRAFIA.....	164
ANEXOS	171
ANEXO I – QUESTIONÁRIO DE OPINIÕES	172
ANEXO II – CARTA ENVIADA AOS PRESIDENTES DOS CONSELHOS EXECUTIVOS	179
ANEXO III - CARTA ENVIADA AOS PROFESSORES DO 11º GRUPO B	181
ANEXO IV – TABELA DE DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS	183
ANEXO V – TABELA DE DADOS DOS QUESTIONÁRIOS	186
ANEXO VI – GUIA DO PROFESSOR	190
ANEXO VII – DESCRIÇÃO GERAL DOS MICRORGANISMOS	216
ANEXO VIII – CONSTRUÇÃO DE UMA CÂMARA DE LUZ UV	219
ANEXO IX – CONSTRUÇÃO DE UM BIORREACTOR	224

Índice de figuras:

FIGURA I – 1: RELAÇÃO ENTRE TRABALHO PRÁTICO, TRABALHO LABORATORIAL, TRABALHO DE CAMPO E TRABALHO EXPERIMENTAL ..	18
FIGURA III – 1: AGREGADO DE SOLO FORMADO POR COMPONENTES MINERAIS E ORGÂNICOS, INDICANDO A LOCALIZAÇÃO DE MICROORGANISMOS DO SOLO ORGANIZADOS EM MICRO-COLÔNIAS.....	38
FIGURA III – 2: CURVA DE CRESCIMENTO TÍPICA DE UMA POPULAÇÃO BACTERIANA	44
FIGURA III – 3: ESQUEMA DA ESTRUTURA DE UM GENE PROCARIOTAS	48
FIGURA III – 4: ESQUEMA DA ESTRUTURA DE UM GENE EUCARIOTAS.	48
FIGURA III-5: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MECANISMOS QUE PODEM OCORRER NUM PROCESSO DE REGULAÇÃO GENÉTICA.	49
FIGURA III - 6: PROCESSO DE REPRESSÃO ENZIMÁTICA.	52
FIGURA III - 7: PROCESSO DE INDUÇÃO ENZIMÁTICA.....	52
FIGURA III - 8: FORMAÇÃO DE UM DÍMERO DE PIRIMIDINA INDUZIDO POR LUZ ULTRAVIOLETA.....	56
FIGURA III - 9: PRINCIPAIS SISTEMAS DE REPARAÇÃO DO ADN	57
FIGURA III - 10: MECANISMO DE FOTORREACTIVAÇÃO.	58
FIGURA III - 11: DIFERENÇA ENTRE A PRODUÇÃO DE METABOLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS.	63
FIGURA III - 12: PROCESSO DE SÍNTESE PROTEICA.....	68
FIGURA III - 13: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA VELOCIDADE DE REACÇÃO ENZIMÁTICA	70
FIGURA III - 14: ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UM PROCESSO INDUSTRIAL DE BIOTECNOLOGIA MICROBIANA	75
FIGURA III-15: ESQUEMA DE UM BIORREACTOR MECANICAMENTE AGITADO.....	84
FIGURA IV – 1: DISTRIBUIÇÃO DAS DISCIPLINAS LECCIONADAS NO PRESENTE ANO LECTIVO PELO TOTAL DOS PROFESSORES INQUIRIDOS.	89
FIGURA IV – 2: DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE CONCORDÂNCIA DOS INQUIRIDOS COM A AFIRMAÇÃO F1	90
FIGURA IV – 3: DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE CONCORDÂNCIA DOS INQUIRIDOS, OBTIDO NAS AFIRMAÇÕES F2 E F3.	91
FIGURA IV – 4: DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE CONCORDÂNCIA DOS INQUIRIDOS, OBTIDO NAS AFIRMAÇÕES F4 E F5.	92
FIGURA IV – 5: DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE CONCORDÂNCIA DOS INQUIRIDOS, OBTIDO NAS AFIRMAÇÕES F6 E F7.....	93
FIGURA IV - 6: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO NÚMERO DE INQUIRIDOS QUE CONSIDERA OU NÃO EXISTIREM OBSTÁCULOS NO ENSINO DA BIOTECNOLOGIA.	94
FIGURA IV - 7: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA POSIÇÃO DOS INQUIRIDOS DA AMOSTRA 1 FASE AOS OBSTÁCULOS QUE O ENSINO DA BIOTECNOLOGIA PODE APRESENTAR.	94
FIGURA IV - 8: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA POSIÇÃO DOS INQUIRIDOS DA AMOSTRA 2 FASE AOS OBSTÁCULOS QUE O ENSINO DA BIOTECNOLOGIA PODE APRESENTAR.	95
FIGURA IV - 9: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PERCENTAGEM DE INQUIRIDOS QUE REALIZA OU NÃO TRABALHO PRÁTICO COM OS SEUS ALUNOS.....	96
FIGURA IV - 10: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA FREQUÊNCIA MÉDIA DA REALIZAÇÃO DE TRABALHO PRÁTICO POR PARTE DOS INQUIRIDOS.	97
FIGURA IV - 11: DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE CONCORDÂNCIA DOS INQUIRIDOS, OBTIDO NA AFIRMAÇÃO J1.....	98
FIGURA IV - 12: DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE CONCORDÂNCIA DOS INQUIRIDOS, OBTIDO NA AFIRMAÇÃO J2.....	98
FIGURA IV - 13: DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE CONCORDÂNCIA DOS INQUIRIDOS, OBTIDO NA AFIRMAÇÃO J3.....	99
FIGURA IV - 14: DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE CONCORDÂNCIA DOS INQUIRIDOS, OBTIDO NAS AFIRMAÇÕES J4, J5 E J6.....	100
FIGURA IV - 15: DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE CONCORDÂNCIA DOS INQUIRIDOS, OBTIDO NAS AFIRMAÇÕES J7 E J8	101
FIGURA IV - 16: DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE CONCORDÂNCIA DOS INQUIRIDOS, OBTIDO NA AFIRMAÇÃO J9.....	102
FIGURA IV - 17: DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE CONCORDÂNCIA DOS INQUIRIDOS, OBTIDO NAS AFIRMAÇÕES J10 E J11	106
FIGURA IV - 18: DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE CONCORDÂNCIA DOS INQUIRIDOS, OBTIDO NA AFIRMAÇÃO J12	103
FIGURA IV - 19: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA POSIÇÃO DOS INQUIRIDOS FASE AOS TIPOS DE AULAS LABORATORIAIS CONSIDERADOS MAIS ADEQUADOS À SALA DE AULA.	104
FIGURA IV - 20: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA POSIÇÃO DOS INQUIRIDOS FASE À POSSIBILIDADE DE EXECUÇÃO DOS TIPOS DE AULA LABORATORIAL NA ESCOLA ONDE CADA INQUIRIDO LECCIONA ACTUALMENTE.	105
FIGURA IV - 21: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO NÚMERO DE ESCOLAS QUE POSSUEM O MATERIAL DE LABORATÓRIO LISTADO.	107
FIGURA IV - 22: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PERCENTAGEM DE INQUIRIDOS QUE CONSIDERAM OU NÃO QUE O NÚMERO DE ALUNOS POR TURMA CONDICIONA A IMPLEMENTAÇÃO DE TRABALHO PRÁTICO.	108
FIGURA IV - 23: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA FREQUÊNCIA DE ESCOLHA DO NÚMERO MÉDIO DE ALUNOS PELOS INQUIRIDOS.....	111
FIGURA IV - 24: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PERCENTAGEM DE INQUIRIDOS QUE CONSIDERAM OU NÃO QUE O TEMPO LECTIVO POR AULA ACTUALMENTE (90 MIN) CONDICIONA A IMPLEMENTAÇÃO DE TRABALHO PRÁTICO	109

FIGURA V-1: ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UM PROCESSO INDUSTRIAL DE BIOTECNOLOGIA MICROBIANA	112
FIGURA V- 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISTRIBUIÇÃO DOS MICRORGANISMOS SELECIONADOS E TESTE PARA DETECTAR A ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	118
FIGURA V- 3: REGISTO FOTOGRÁFICO DO RESULTADO DO PLAQUEAMENTO DA DILUIÇÃO 10^{-3} , DA AMOSTRA DE SOLO, OBTIDO PARA CADA UM DOS MEIOS DE CULTURA.	134
FIGURA V- 4: REGISTO FOTOGRÁFICO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA ESTIRPE INDICADORA POR ACÇÃO DO ANTIBIÓTICO PRODUZIDO PELO MICRORGANISMO DO SOLO.	135
FIGURA V- 5: REGISTO FOTOGRÁFICO DA ACTIVIDADE PROTEOLÍTICA DE MICRORGANISMOS DO SOLO.....	137
FIGURA V- 6: REGISTO FOTOGRÁFICO DO PORMENOR DO HALO FORMADO NO MEIO DEVIDO À ACTIVIDADE PROTEOLÍTICA DE MICRORGANISMOS DO SOLO.	137
FIGURA V- 7: REGISTO FOTOGRÁFICO DA ACTIVIDADE LIPOLÍTICA DE MICRORGANISMOS DO SOLO.....	138
FIGURA V- 8: REGISTO FOTOGRÁFICO DO BIOENSAIO DA CULTURA DO MICRORGANISMO IRRADIADO COM LUZ UV.	139
FIGURA V- 9: REGISTO FOTOGRÁFICO DOS RESULTADOS DO BIOENSAIO DE UMA CULTURA DE MICRORGANISMO PRODUTOR DE ANTIBIÓTICO.....	140
FIGURA V- 10: REGISTO FOTOGRÁFICO DOS RESULTADOS DO BIOENSAIO DE UMA CULTURA DE MICRORGANISMO PRODUTOR DE ANTIBIÓTICO.....	141
FIGURA V- 11: REGISTO FOTOGRÁFICO DOS RESULTADO DO EFEITO DA LUZ UV NA PRODUÇÃO DE PROTEASES EXTRACELULARES...	142
FIGURA V- 12: REGISTO FOTOGRÁFICO DOS RESULTADOS DO EFEITO DA LUZ UV NA PRODUÇÃO DE PROTEASES EXTRACELULARES OBTIDOS POR DILUIÇÕES DA AMOSTRA.....	142
FIGURA V- 13: REGISTO FOTOGRÁFICO DA ACTIVIDADE LIPOLÍTICA DE UM MICRORGANISMO DO SOLO SUJEITO A IRRADIAÇÃO UV.....	143
FIGURA V- 14: REGISTO FOTOGRÁFICO DA DIFERENÇA NA TONALIDADE DO HALO DE DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO ICA OBTIDA NA AMOSTRA IRRADIADA A 1 MINUTO (A) E 3 MINUTOS (B) COM LUZ UV.	144
FIGURA V- 15: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO EFECTUADO NA DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA LUZ UV SOBRE UMA LIPASE.	144
FIGURA V- 16 - REGISTO FOTOGRÁFICO DO BIOENSAIO DAS AMOSTRAS DA CULTURA DO MICRORGANISMO AO LONGO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO.....	147
FIGURA V- 17: REGISTO FOTOGRÁFICO DO BIORREACTOR AO LONGO DE UM PROCESSO FERMENTATIVO EM “BATCH” DE PRODUÇÃO DE PROTEASES PELO MICRORGANISMO SELECIONADO.	148
FIGURA V- 18: REGISTO FOTOGRÁFICO DO TESTE DE DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DO FILTRADO DAS AMOSTRAS RETIRADAS DO BIORREACTOR A DIFERENTES TEMPOS DE CRESCIMENTO..	149
FIGURA V- 19:REGISTO FOTOGRÁFICO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA DE UM DETERGENTE DOMÉSTICO. ...	150

Índice de tabelas:

TABELA II - 1: DISTRITOS, CIDADES, RESPECTIVAS ESCOLAS E NÚMERO DE PROFESSORES INQUIRIDOS QUE CONSTITUEM A AMOSTRA 1 EM ESTUDO.....	25
TABELA II - 2: DISTRITOS, CIDADES, RESPECTIVAS ESCOLAS E NÚMERO DE PROFESSORES INQUIRIDOS QUE CONSTITUEM A AMOSTRA 2 EM ESTUDO.....	26
TABELA II - 3: TIPOS E MODALIDADES DAS PERGUNTAS DO QUESTIONÁRIO	30
TABELA III.1: PRODUTOS OBTIDOS POR PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS	35
TABELA III.2: PRINCIPAIS COMPOSTOS E CONDIÇÕES NECESSÁRIAS NO CRESCIMENTO MICROBIANO NA NATUREZA	38
TABELA III.3: BIOMASSA E NÚMEROS APROXIMADOS DE MICROBIOTA DE UM SOLO FÉRTIL.....	39
TABELA III.4: MACRONUTRIENTES ENCONTRADOS NA NATUREZA E EM MEIOS DE CULTURA	41
TABELA III- 5: MICRONUTRIENTES (ELEMENTOS TRAÇOS) NECESSÁRIOS AOS SERES VIVOS	41
TABELA III.6: CATEGORIAS NUTRICIONAIS DE ORGANISMOS NUMA CLASSIFICAÇÃO QUE COMBINA A NATUREZA DAS FONTES DE CARBONO E DE ENERGIA.	42
TABELA III - 7: IMPORTÂNCIA RELATIVA DOS GRUPOS MICROBIANOS PRODUTORES DE ANTIBIÓTICOS	61
TABELA III - 8: ALGUNS ANTIBIÓTICOS DE INTERESSE COMERCIAL E RESPECTIVOS MICRORGANISMOS PRODUTORES.....	62
TABELA III - 9: CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS POR CLASSES E ALGUNS EXEMPLOS DE ENZIMAS INDUSTRIAIS.....	70
TABELA III - 10: ENZIMAS MICROBIANAS E SUAS APLICAÇÕES	71
TABELA IV – 1: DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE INQUIRIDOS POR INTERVALOS DE IDADE DEFINIDOS	87
TABELA IV – 2: DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE INQUIRIDOS SEGUNDO O SEXO.	88
TABELA IV – 3: DISTRIBUIÇÃO DO TOTAL DOS INQUIRIDOS SEGUNDO O NÚMERO DE ANOS DE SERVIÇO	88
TABELA V - 1: ENQUADRAMENTO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS NOS CONTEÚDOS CONCEITUAIS DO PROGRAMA NACIONAL DE BIOLOGIA 12ºANO.	113
TABELA V - 2: PREÇO APROXIMADO EM EUROS DO MATERIAL NECESSÁRIO PARA OS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	131
TABELA V - 3: COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA CONFIRMAÇÃO DO EFEITO DA UV SOBRE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE METABOLITOS (ANTIBIÓTICO, PROTEASES EXTRACELULARES E LIPASES EXTRACELULARES) COM PROCEDIMENTOS EFECTUADOS NO ESCURO E COM LUZ, EVIDENCIA DA OCORRÊNCIA DE MECANISMOS DE FOTORREACTIVAÇÃO.	146
TABELA V - 4: REPRESENTAÇÃO DOS DIÂMETROS DO HALO DE INIBIÇÃO DA ESTIRPE INDICADORA OBTIDOS AO LONGO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO COM MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ANTIBIÓTICO.....	147
TABELA V - 5: REPRESENTAÇÃO DOS DIÂMETROS DO HALO DE DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO AO LONGO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO COM O MICRORGANISMO PRODUTOR DE PROTEASES.....	148
TABELA V - 6: REPRESENTAÇÃO DOS DIÂMETROS DO HALO DE DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO AO LONGO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO COM O MICRORGANISMO PRODUTOR DE PROTEASES.....	149

Capítulo I

Problemática em estudo

1. Introdução

Neste primeiro capítulo, são apresentadas as bases teóricas (relacionadas com as actuais preocupações da educação em Ciências e integradas no ensino secundário português, em particular no ensino da Biologia do 12º ano de escolaridade) que levaram à selecção do tema deste trabalho.

Numa segunda parte, deste mesmo capítulo, é definido o problema em estudo, os pressupostos em que assenta e os objectivos que se pretendem atingir. Descreve-se ainda, de forma sucinta, a organização do trabalho e o modo como o mesmo foi desenvolvido.

2. Educação em Ciências: a importância da literacia científica

“Entrar no século XXI com a mesma consciência do século XX era o mesmo que entrar na idade moderna com a consciência da idade média. Seria não só inapropriado como perigoso” (Ervin Laszlo, 1997 *in* Silva, 1999).

A acelerada mudança tecnológica e a globalização, com as quais nos deparamos actualmente, exigem indivíduos com uma educação geral em diversas áreas, capacidade de comunicação, flexibilidade adaptativa e capacidade de aprender ao longo da vida. Tendo em conta estas exigências, torna-se importante um ensino das Ciências orientado para a sociedade, para tal, centrado no indivíduo; contribuindo para a formação de cidadãos informados e participativos que possam assumir responsabilidades das decisões na resolução de problemas científicos e tecnológicos. Ou seja, cada vez mais, um indivíduo necessita de um nível de conhecimento científico e tecnológico, que lhe permita compreender os métodos com os quais a Ciência fornece provas para as novas propostas dos cientistas, apreciando, desta forma, as potencialidades e os limites das evidências científicas, para poder fazer uma avaliação cuidadosa dos riscos e para poder identificar as implicações éticas e morais das diferentes possibilidades de acção que a Ciência oferece (Millar e Osborne, 1998).

A literacia científica é o nível de conhecimento científico e tecnológico necessário para se poder actuar minimamente como cidadão responsável e consumidor na sociedade (Miller, 1994). Esta definição implica: um vocabulário científico e técnico básico; uma compreensão dos processos e métodos da Ciência para estudar a realidade; e uma compreensão do impacto da Ciência e da Tecnologia nos indivíduos e na sociedade. Esta literacia é adquirida por cada indivíduo desde o ensino básico, sendo, ao longo de toda a escolaridade, enriquecido. Os alunos que continuam os seus estudos pelo ensino secundário têm assim a oportunidade de aperfeiçoar, complementar e enriquecer os conhecimentos científicos e tecnológicos, ou seja, a sua literacia científica.

Para se implementar a literacia científica em cada indivíduo, é necessário que desde criança, este seja levado a desenvolver a curiosidade sobre o mundo que o rodeia, e seja orientado de forma a ter confiança nas

suas próprias capacidades para o questionar; desencadeando o entusiasmo e o interesse pela Ciência, fazendo-o sentir-se competente para se envolver em assuntos de natureza científica e/ou tecnológica. É necessário ajudar os jovens a adquirir um conhecimento geral das ideias e explicações mais importantes da Ciência e dos procedimentos científicos, que têm mais impacto no nosso ambiente e na nossa cultura, para que possam avaliar a razão pela qual essas ideias são valorizadas, avaliar os raciocínios que suportam as decisões que defendem ou que tomam, no seu dia-a-dia, ser capaz de entender e tomar uma atitude crítica em relação a notícias que são divulgadas pelos *media*, sentir-se com capacidade para apresentar e defender publicamente um ponto de vista próprio, sobre assuntos com uma componente científica e talvez até, envolver-se activamente, ampliar os seus conhecimentos sempre que necessário, seja por interesse pessoal, seja por motivos relacionados com uma futura opção profissional (Millar e Osborne, 1998).

A Educação em Ciências no ensino secundário, não consegue desenvolver nem manter, na maioria dos jovens, a curiosidade que geralmente possuem no ensino básico, há aparentemente uma ruptura entre o currículo escolar de Ciências e os interesses dos jovens, que os leva a não prosseguir nesta área de estudos (Millar e Osborne, 1998). É imperativo alterar esta tendência, desenvolvendo o interesse e entusiasmando nos jovens pelo estudo da Ciência, permitindo assegurar, que alguns dos alunos prossigam os seus estudos numa área científica ou tecnológica, formando-se entre eles professores de Ciências que, voltando à escola, assegurem o caminho para uma sociedade futura em que todos os cidadãos sejam cientificamente literados (Woolnough, 1997 *in* Silva, 1999).

3. O ensino das Ciências no contexto CTS

A abordagem CTS (Ciência-Tecnologia-Sociedade) para o ensino das Ciências assenta na escolha de temas sócio-tecnológicos, a partir dos quais a aprendizagem dos conceitos científicos ganha algum sentido. Esta perspectiva de ensino proporciona uma visão integradora dos saberes, liga a escola à sociedade, para além de desenvolver o interesse e a curiosidade dos alunos pelas Ciências (Martins *et al*, 2000).

A perspectiva de ensino CTS para o ensino das Ciências releva a importância do ensinar a resolver problemas, a confrontar pontos de vista, a analisar criticamente argumentos, a discutir os limites de validade de conclusões alcançadas e a saber formular novas questões (Martins, 2002).

A perspectiva CTS tem como objectivo principal, atribuir ao ensino em Ciências o papel de preparar os alunos para enfrentar o mundo sócio-tecnológico em mudança, no qual os valores sociais e éticos são factores relevantes. A valorização do quotidiano para um ensino contextualizado assume-se como um aspecto fundamental num processo de ensino-aprendizagem.

O ensino é uma actividade social pelo que tem de ser conduzido, necessariamente, em contextos sociais. A escolha de temas e contextos familiares e sociais é fundamental na organização de programas escolares e de estratégias de ensino (Martins, 2002).

A “National Science Teachers Association” (NSTA) considera a abordagem CTS como o processo de ensino-aprendizagem da Ciência e da Tecnologia no contexto da experiência humana, que consiste no envolvimento dos alunos em experiências e assuntos científicos ou tecnológicos que se encontram directamente ligados às suas vidas. (Canavarro, 1999).

Um processo de ensino-aprendizagem com base numa abordagem CTS possibilita aos alunos um papel consciente e activo na sociedade contribuindo, desta forma, para a literacia científica dos cidadãos. Ao envolver no processo de ensino-aprendizagem a intervenção dos alunos na formação da sua aprendizagem, a qual se fará de forma mais significativa, suscita-se o interesse e curiosidade, motiva todo um trajecto de exploração, quer por parte dos alunos, quer dos professores (Canavarro, 1999).

4. O processo de ensino/aprendizagem nas disciplinas de Biologia no ensino secundário

A Biologia é considerada por muitos alunos como uma disciplina atractiva e útil, podendo abrir caminho para uma vasta gama de carreiras profissionais. Muitos temas actuais, tais como, os processos de manipulação genética, o controlo do crescimento populacional, o controlo da poluição, situam-se nesta área de estudo. No entanto, apesar desta posição favorável, é necessário preparar o futuro, repensar metodologias de ensino. (Silva, 1999).

É necessário reconhecer a relevância da Biologia, em particular da Biotecnologia, nos dias de hoje, uma vez que influencia a qualidade de vida da sociedade, ao apresentar alternativas e originar questões que exigem tomadas de decisão a nível científico-tecnológico e sócio-ético.

As possíveis aplicações da Biotecnologia e a sua influência na sociedade mostram o quanto é importante compreender e ensinar esta Ciência.

Como é referido no Programa Nacional de Biologia do 12º ano, “a Biologia desempenha um papel relevante na construção da sociedade e da cultura, pelo que não poderá deixar de ser uma componente essencial na educação dos cidadãos. O seu ensino deve permitir que os jovens compreendam aspectos da natureza da própria Ciência e da construção do conhecimento científico” (Mendes *et al*, 2004).

Não se pretende que o ensino da Biologia vise apenas transmitir aos alunos conhecimentos específicos, mas sim ensinar Biologia pela sua principal função de contribuir para a educação geral de cada cidadão.

“O modelo educativo subjacente ao ensino da Biologia deve ser centrado nos alunos, isto é, os processos de ensino-aprendizagem devem ter em conta os conhecimentos prévios e as vivências dos educandos. Aos

professores, conhecedores de tais realidades, cabe seleccionar os contextos e os processos mais apropriados para que os fins sejam atingidos” (Mendes *et al*, 2004). Com o ensino da Biologia pretende-se reforçar em cada aluno a capacidade de abstracção, experimentação, trabalho em equipa, ponderação e sentido de responsabilidade desenvolvidos a partir das estratégias susceptíveis a adoptar neste mesmo ensino.

Nesta investigação, em concordância com diversos autores (e.g. Mendes *et al*, 2004; Leite, 2001) é reforçada a ideia da necessidade de valorizar metodologias de ensino como parte integrante e fundamental dos processos de ensino-aprendizagem.

5. Metodologias de ensino das Ciências

A utilização de ferramentas diversificadas e motivadoras torna-se muito importante para fazer chegar aos alunos as redes conceptuais de base, no intuito de alargar as capacidades dos alunos de utilizar o conhecimento em novas situações. É prioritário que cada professor adopte metodologias de ensino que valorizem a criatividade e o ensino crítico, indispensáveis a uma aprendizagem autónoma.

A utilização o Trabalho Prático como ferramenta didáctica aliada a um ensino de qualidade, centrado nas necessidades e capacidades de cada aluno, pode fazer chegar a cada um destes as informações que se pretende de forma mais apelativa. A eficácia e utilidade do Trabalho Prático dependem do modo como é usado, é necessário contribuir para a utilização mais fundamentada deste, no ensino das Ciências.

5.1. A importância de Trabalho Prático no ensino das Ciências

O ensino das Ciências no nosso país tem sido desequilibrado no que diz respeito à relação que deve haver entre teoria e prática, e aí reside uma das razões para o insucesso desse ensino e para a desmotivação, por parte de muitos alunos (Valadares, 2002).

O conhecimento e compreensão dos conceitos científicos devem estar associados ao conhecimento e compreensão dos processos científicos. O Trabalho Prático pode fornecer algum suporte ao ensino-aprendizagem do conhecimento científico, mas deve ser visto como uma estratégia de comunicação desse conhecimento e não comparado à actividade dos cientistas (Silva, 1999).

Antes de mais à que definir Trabalho Prático, definição esta que nem sempre é unânime. Ao longo deste trabalho, o Trabalho Prático vai ser considerado como sendo, todo e qualquer trabalho laboratorial, trabalho de campo e trabalho experimental.

Cada um dos tipos de Trabalho Prático (figura I-1) exige níveis cognitivos diferentes e ocorre em locais diferentes. O **Trabalho de Prático** engloba toda e qualquer actividade em que os alunos se envolvem activamente nos seus diversos domínios, cognitivo, afectivo e psicomotor. Trata-se do conceito mais geral e

abrangente (Hodson, 1988, *in* Dourado, 2001). O **trabalho laboratorial** é o trabalho prático que decorre no laboratório ou numa sala de aula, em que estão criadas as condições para que os alunos manipulem material laboratorial. Abrange todas as actividades realizadas num laboratório, desde simples demonstrações a projectos de investigação, em que o aluno tem que estudar o problema, fazer pesquisa bibliográfica, formular hipóteses e desenhar a montagem experimental. O **trabalho de campo** decorre no campo, mas não difere significativamente do trabalho laboratorial, recorrendo muitas vezes a instrumentos que provêm dos laboratórios. E a denominação de **trabalho experimental** deve reservar-se para todo e qualquer trabalho prático que envolva manipulação e controlo de variáveis. O aluno terá, para se envolver em trabalho experimental, de ter a prontidão cognitiva para estudar a variação de uma grandeza G , função de diversas variáveis, $G = f(v_1, v_2, v_3, \dots)$, ou seja, ser capaz de fixar as variáveis em função de uma outra, para estudar a variação de G (Valadares, 2002).

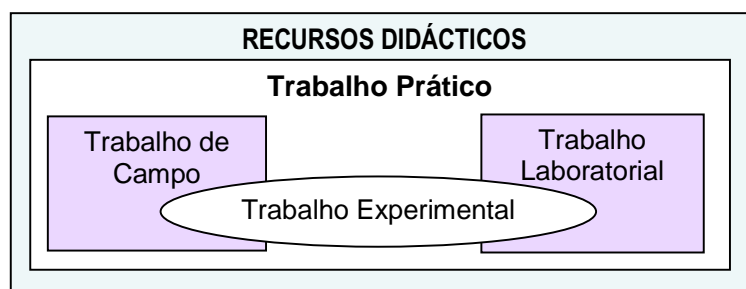


Figura I – 1: Relação entre Trabalho Prático, trabalho laboratorial, trabalho de campo e trabalho experimental (*adaptado de Hodson in Leite, 2001*)

O Trabalho Prático pode ser realizado como fazendo parte de uma apresentação inicial do tema, como uma evidência que levou as pessoas a pensar de determinada forma ou como um recurso para ajudar os alunos a ir ao encontro dos fenómenos, tal como são interpretados. No final, o aluno poderá elaborar um relatório, oral ou escrito, que servirá de confronto de opiniões e eventualmente para uma revisão das suas próprias ideias (Sutton, 1998 *in* Silva 1999). O Trabalho Prático, seja este de que natureza for, deve sempre estar contextualizado com os conteúdos programáticos a abordar. Um desfasamento entre o Trabalho Prático e os conteúdos programáticos poderá ser uma das razões para o seu insucesso. Todos os alunos deverão ter claro o “porquê” e o “para quê” de cada ferramenta didáctica adoptada.

Não é necessário realizar Trabalho Prático em todas as aulas, nem recorrer a procedimentos experimentais muito complexos (Woolnough, 1997 *in* Silva 1999). Naturalmente, nem todos os assuntos poderão ser estudados recorrendo ao Trabalho Prático, não haveria tempo nem meios materiais, nas escolas (Silva, 1999).

O ensino-aprendizagem das Ciências não pode estar dependente da possibilidade de realizar Trabalhos Práticos em todas as aulas, estes devem ser considerados como um dos vários tipos de actividades que podem ser utilizadas no processo de ensino-aprendizagem.

5.2. O Trabalho Prático no ensino da Biologia

No âmbito do ensino da Biologia, a promoção de um ensino de qualidade deverá envolver o desenvolvimento de atitudes de problematização sobre os vários processos que se desenrolam nos diversos sistemas terrestres, visando, a realização de actividades práticas relevantes para a resolução dos problemas.

É fundamental que as actividades de Trabalho Prático no âmbito da Biologia partam de situações problemáticas abertas que, para além de despertarem interesse nos alunos, os aproximem dos problemas do quotidiano, conferindo assim, aos conteúdos conceptuais alguma aplicabilidade na realidade social. Contudo, a extensão do programa de Biologia, associada à grande dimensão das turmas em relação ao material disponível nas escolas, tem afastado alguns professores, da realização de actividades laboratoriais nas aulas de Biologia (Silva, 1999).

6. O problema da investigação

Em secções anteriores fez-se referência à importância do ensino das Ciências, no ensino secundário, dado um ênfase especial ao ensino da Biologia, cujos temas são já hoje e serão no futuro, de particular relevância.

O ensino da Biotecnologia e da Microbiologia, na disciplina de Biologia do 12º ano de escolaridade, promove o interesse dos alunos e motiva-os para o estudo da Biologia, dado que estas áreas abordam temas da actualidade, ilustram a integração da investigação científica básica na Biologia aplicada, no entanto, por serem áreas em grande desenvolvimento, torna-se difícil adoptar metodologias adequadas para o seu ensino.

Considerando o contexto socio-económico-político da sociedade actual, a literacia científica, como já se referiu, surge como uma preocupação do ensino das Ciências. A implementação de currículos que evidenciem as inter-relações entre o contexto CTS surge como uma via possível para facilitar esta literacia. No entanto, colocar em prática estes currículos no contexto da sala de aula é um processo que, apesar de se apresentar difícil, é central no sistema educativo.

Ao propor-se materiais didácticos pretende-se que estes sirvam como ponto de partida para um trabalho de análise crítica, com vista à sua adaptação a novos contextos de aprendizagem. Nesta perspectiva os currículos de Ciências não podem circunscrever-se a uma listagem de conceitos sobre os problemas que afectam a sociedade e possíveis soluções, mas têm de corresponder a propostas capazes de responder às necessidades sócio-culturais (Cachapuz *et al*, 2002).

O currículo actual de Biologia do 12º ano em Portugal introduz novas propostas metodológicas, e novas áreas da Biologia, visando, promover nos alunos, uma compreensão mais adequada sobre o desenvolvimento do conhecimento científico, assim como, promover atitudes de abertura e interesse pelos assuntos tecnológicos, políticos e sócio-culturais que enquadram esta disciplina. Neste sentido, tornou-se oportuno a construção de materiais didácticos para as práticas pedagógicas, susceptíveis de contribuírem para a exploração dos contextos inerentes à produção do conhecimento científico.

Vários estudos mostram, actualmente, que o Trabalho Prático promove o interesse e a motivação dos alunos pelas aulas de Ciências. “Parece ser também uma contribuição positiva para a compreensão da natureza da Ciência e da actividade científica” (Almeida, 2001). Reflecte-se, desta forma, a necessidade de investir em investigação educacional nestas áreas, em Universidades com a parceria de professores de Biologia; tendo a finalidade de desenvolver metodologias de ensino, recorrendo, por exemplo à optimização procedimentos experimentais e construção de materiais, os quais consigam acompanhar, na medida do possível, o actual desenvolvimento da Biologia e a realidade das escolas, aumentando o interesse e a curiosidade dos alunos.

6.1. Questões e objectivos da investigação

Pretende-se que esta investigação venha a ajudar os professores do 11º grupo B a integrar a Biotecnologia e a Microbiologia no Programa Nacional de Biologia de 12º ano de escolaridade, num contexto de sala de aula, seleccionando e adaptando recursos e informações básicas sobre as unidades didácticas abordadas durante este ano de escolaridade.

Enunciada a problemática em que esta investigação se insere, colocam-se as seguintes questões gerais para o desenvolvimento deste estudo.

QUESTÕES PROBLEMA:

- É importante promover o ensino da Biotecnologia e da Microbiologia na disciplina de Biologia do 12º ano de escolaridade?
- Poderá o Trabalho Prático ser uma mais valia para o estudo da Biotecnologia e da Microbiologia nas escolas?
- Será a aplicação do Trabalho Prático na área da Biotecnologia e da Microbiologia exequível no contexto actual do ensino secundário?

Partindo destas questões e dos pressupostos da problemática em que se inserem, definiram-se os seguintes objectivos de investigação:

OBJECTIVOS:

1. Conhecer as opiniões de diversos autores acerca do ensino das Ciências nas escolas com base no Trabalho Prático;
2. Conhecer as opiniões de diversos professores do 11º grupo B acerca do ensino da Biotecnologia e Microbiologia nas escolas com base no Trabalho Prático;
3. Conceber ferramentas didácticas para auxiliar o ensino da Biotecnologia e a Microbiologia adaptadas à realidade das escolas portuguesas e integradas nos conteúdos programáticos;

6.2. Organização do estudo

De forma a atingir os objectivos definidos, o estudo desenvolvido foi organizado em três partes distintas, descritas nos capítulos seguintes:

1ª PARTE – Contextualização e revisão do problema:

Revisão bibliográfica – Nesta fase da investigação foi feita a pesquisa bibliográfica com vista à identificação das potencialidades, obstáculos e recomendações da investigação educacional relativamente à integração do ensino da Biotecnologia, da Microbiologia e do Trabalho Prático no processo de ensino-

aprendizagem na disciplina de Biologia do 12º ano de escolaridade. Construindo-se a problemática, objectivos e enquadramento desta investigação.

Recolha de opiniões – Neste ponto da investigação foi construído e distribuído um questionário de opiniões que visou o levantamento de ideias de uma população de professores do 11º grupo B acerca da importância do ensino da Biotecnologia e Microbiologia na disciplina de Biologia do 12º ano e da implementação do Trabalho Prático como ferramenta didáctica na mesma disciplina.

Seleção dos procedimentos experimentais – Com base na pesquisa bibliográfica, recolha de opiniões e análise do Programa de Biologia do 12º ano procedeu-se à escolha dos temas e conteúdos programáticos a explorar durante a investigação. A partir dos quais, foram seleccionados e planificados os procedimentos experimentais a construir e otimizar.

Pesquisa bibliográfica das temáticas envolvidas – Efectuou-se a pesquisa bibliográfica relacionada com cada um dos temas envolvidos nos procedimentos experimentais.

2ª PARTE – Desenvolvimento dos procedimentos experimentais

Realização do trabalho em laboratório – Tendo em conta a realidade das escolas portuguesas no que diz respeito à disponibilidade de equipamentos, materiais e tempo lectivo, foram testados, recreando as condições das escolas secundárias, os procedimentos experimentais seleccionados. Construindo-se, posteriormente, o guia do professor.

3ª PARTE – Tratamento dos resultados e discussão

Tratamento de dados – Nesta fase, analisaram-se os dados recolhidos nos questionários de opiniões.

Análise dos procedimentos experimentais – Tendo em conta a realidade das escolas, o preço e tempo de execução foi efectuada uma análise crítica acerca da exequibilidade dos procedimentos experimentais.

Discussão geral e sugestões educacionais – Relembrando as questões de investigação e as suas implicações educacionais para o ensino da Biologia ao nível do ensino secundário foi efectuada a discussão deste trabalho.

Capítulo II
Metodologia da Investigação

1. Introdução

Neste capítulo é feita a descrição dos procedimentos, utilizados no estudo realizado, que se consideraram necessários para dar cumprimento aos objectivos propostos. Será dado ênfase ao trabalho de recolha de dados dos questionários, sendo num capítulo posterior descrito todo o trabalho laboratorial executado na construção dos procedimentos experimentais.

Para tornar a apresentação mais clara e objectiva, este capítulo está subdividido em seis secções que incluem:

- A descrição do estudo;
- A definição da população envolvida;
- A selecção das técnicas de investigação para a recolha de dados;
- A elaboração e validação dos instrumentos;
- Os procedimentos seguidos para a recolha de dados;
- Os métodos utilizados na análise dos dados.

2. Descrição do estudo

O presente estudo visou, considerando o universo das escolas portuguesas do ensino secundário da rede pública, dar resposta às questões de investigação formuladas, já referidas no primeiro capítulo deste trabalho, complementando e valorizando o trabalho de laboratório realizado (capítulo V).

Decorrentes das questões formuladas e tendo em conta o tipo de informação que se considerou necessária, todo o trabalho que se segue visa chegar às suas respostas tendo como linha condutora os objectivos definidos. Para tal, foi recolhida informação usando como instrumento de recolha um questionário de opiniões, dirigido a professores do 11º grupo B.

3. População e amostra

Atendendo à finalidade deste estudo, a população alvo é constituída por todos os professores do 11º grupo B, Biologia e Geologia. Na impossibilidade de questionar toda a população, por factores relacionados com o tempo, custos e acessibilidade, optou-se por restringir o estudo apenas a uma parte da população constituindo, nesse sentido, 2 amostras. Optou-se assim, por considerar alguns professores do 11º grupo B que se encontram a leccionar em escolas com ensino secundário do distrito de Aveiro, distrito da Guarda e distrito de Santarém, perfazendo um total de 35 professores distribuídos por 6 escolas, que constituem a **Amostra 1**. A escolha destas escolas foi aleatória tendo-se, somente, em conta a facilidade de acesso.

A **Amostra 2** constitui um total de 13 professores, do mesmo grupo de ensino, que leccionam em diversas escolas secundárias e que frequentaram a acção de formação da Doutora Tina Lopes intitulada “Manipulação de ADN – Desafios no novo programa de Biologia 12º ano” no Centro de Formação das Escolas do Concelho de Ílhavo. A escolha desta amostra teve em conta o interesse da acção e a similaridade do tema com o trabalho desenvolvido nesta investigação.

3.1. Caracterização das amostras

Relativamente à caracterização das amostras, podemos dizer que todos os professores inqueridos leccionam em escolas com ensino secundário, níveis de ensino pertencentes ao 3º ciclo e/ou ensino secundário.

Fazem parte da **Amostra 1**, oito escolas que pertencem a três distritos, Aveiro, Guarda e Santarém. Três escolas pertencentes ao distrito de Aveiro, três do distrito da Guarda e duas do distrito de Santarém. No entanto, uma escola do distrito de Aveiro e outra do distrito de Santarém não respondeu ao questionário, alegando falta de tempo. Obtiveram-se, desta forma, resultados de seis escolas (tabela II-1), totalizando a amostra 35 professores.

Tabela II - 1: Distritos, cidades, respectivas escolas e número de professores inquiridos que constituem a Amostra 1 em estudo.

Distrito	Cidade	Escolas	Nº. de professores
Aveiro	Aveiro	Escola Secundária Homem de Cristo	5
	Gafanha da Nazaré	Escola Secundária com 3º Ciclo da Gafanha da Nazaré	5
Guarda	Guarda	Escola Secundária com 3º ciclo da Sé	8
	Guarda	Escola Secundária com 3º Ciclo Afonso Albuquerque	5
	Pinhel	Escola Secundária com 3º Ciclo de Pinhel	5
Santarém	Rio Maior	Escola Secundária Rio Maior	7

Quanto à **Amostra 2**, esta é constituída por 8 escolas secundárias num total de 13 Professores, distribuídos por três distritos, Aveiro, Porto e Coimbra (Tabela II-2).

Tabela II - 2: Distritos, cidades, respectivas escolas e número de professores inquiridos que constituem a Amostra 2 em estudo.

Distrito	Cidade	Escolas	Nº. de professores
Aveiro	Aveiro	Escola Secundária José Estêvão	1
	Estarreja	Escola Secundária de Estarreja	2
	Oliveira de Azeméis	Escola Secundária com 3º Ciclo Soares Basto	4
	Ílhavo	Escola Secundária Dr. José Carlos Celestino Gomes	1
	Albergaria-a-Velha	Escola Secundária com 3º Ciclo de Albergaria-a-Velha	2
	Oliveira do Bairro	Escola Secundária de Oliveira do Bairro	1
Coimbra	Mira	Escola Secundária com 3º Ciclo Dr.ª Maria Cândida	1
Porto	Vila Nova de Gaia	Escola Secundária com 3º Ciclo Condes de Resende	1

Uma caracterização mais pormenorizada dos inquiridos de cada amostra será feita, posteriormente no capítulo de descrição e análise dos resultados estatísticos (Capítulo IV).

3.2. Selecção das técnicas de investigação

No intuito de responder às questões levantadas, optou-se pela realização de um estudo do tipo descritivo, considerado mais adequado quando se pretende descrever uma situação, um fenómeno, um sujeito ou um grupo de sujeitos, dentro de um determinado contexto (Rousseau, 1990). No entanto, estes estudos apenas permitem generalizações provisórias, sujeitas ao contexto e ao tempo, embora permitam muitas vezes o surgimento de hipóteses que poderão ser estudadas posteriormente.

Tendo em conta os métodos de recolha de dados que melhor se adaptam aos estudos descritivos (Rousseau, 1990), foi seleccionada a técnica do inquérito por questionário para a recolha de dados. Esta escolha prendeu-se fundamentalmente com o tamanho da amostra e consequentemente o tempo disponível para a realização desta pesquisa.

Os inquéritos (entrevista não-estruturada, entrevista estruturada, questionário aberto e questionário fechado) podem ser classificados com base na sua maior ou menor directividade, numa escala cujos extremos vão da entrevista não-estruturada ao questionário fechado (Correia e Pardal, 1995). Esta classificação baseia-se no grau de liberdade que é dado à pessoa inquirida, para escolher os temas sobre os quais expressará o seu ou outro ponto de vista e os termos que empregará para o fazer.

No caso, da presente investigação, foi utilizado o questionário como método de investigação, esta decisão foi tomada tendo em conta diversos critérios (Quivy e Campenhoudt, 1998):

- Adequação do método aos objectivos da investigação;

- Principais vantagens;
- Limites e problemas;
- Modelo de análise dos dados;
- Capacidades e experiências do investigador.

Um questionário é, por definição, um instrumento de recolha de dados que consiste numa lista de questões, rigorosamente estandardizado, tanto no texto das questões como na sua ordem. O objectivo de um instrumento desta natureza é obter respostas possíveis de descrever, comparar e relacionar, demonstrando, se possível, que certos grupos têm determinadas características (Bell, 1997).

Todas as técnicas de investigação têm as suas vantagens e desvantagens, quando falamos em questionários existem algumas desvantagens a ter em conta. Tais como, a dificuldade que pode surgir na interpretação dos dados, quer porque se podem apresentar confusos devido à dificuldade dos respondentes em explicitarem as suas ideias, quer porque quem interpreta as respostas lhes pode atribuir significado diferente da do inquirido (Ghiglione e Matalon, 1992). O questionário é considerado uma técnica que leva a racionalizações, facilitador de respostas em grupo, nomeadamente se enviado por correio, o que pode perturbar os dados; a sua utilização só é viável em universos razoavelmente homogéneos, capazes de compreender o conteúdo, que deve ser adequado, adaptado e compreensível para todos; são frequentes os atrasos na sua devolução, sobretudo quando tal é feito por correio (Correia e Pardal, 1995). Outro aspecto a considerar é o anonimato inerente a esta técnica, o qual, por vezes, torna difícil descobrir os motivos que levaram os inquiridos a não responder a determinada questão ou a responder de determinada forma.

Apesar das desvantagens referidas, um questionário oferece a possibilidade de economizar tempo, garantindo o anonimato aos inquiridos, condição necessária para a autenticidade das respostas; quando comparada com outros instrumentos de recolha de dados, é barata, mesmo quando enviada pelo correio (Correia e Pardal, 1995; Bell, 1997); não precisa de ser respondido de imediato, o que permite a escolha da hora adequada para o fazer, proporcionando uma maior liberdade de respostas; e facilita o tratamento estatístico dos dados (Correia e Pardal, 1995);

Apesar das amostras realizadas apresentarem uma dimensão relativamente reduzida para a aplicação desta técnica o que justificava a utilização de técnicas diferentes de recolha de dados (por exemplo: entrevista), optou-se por utilizar o questionário. Tomou-se esta opção, tendo em conta os seguintes aspectos:

- O tempo disponível para a recolha de dados;
- A dimensão do questionário (16 questões, muitas delas com vários itens) geradora de um grande volume de informação, que seria difícil de tratar no caso de entrevista;

- E as próprias vantagens que esta técnica de recolha de dados apresenta.

4. Elaboração e validação do questionário

A elaboração do questionário teve por base as questões da investigação definidas e a bibliografia consultada sobre o assunto.

4.1. Elaboração do questionário

Antes da elaboração de um questionário existe todo um trabalho prévio, que conduz à definição das perguntas a colocar de acordo com um quadro teórico de referência.

Um questionário deve ter uma boa apresentação, tendo desta forma uma maior probabilidade de ser bem acolhido pelos inquiridos. Deve apresentar uma nota introdutória, a qual, identifica o investigador, explica os objectivos do estudo e apela à sua colaboração, garantindo o anonimato ao inquirido, agradecendo no final desta a colaboração prestada, indicando também a data (mês e ano). O questionário termina com mais um agradecimento aos inquiridos e o nome do investigador.

A elaboração das questões passa pela opção por diferentes modalidades e tipos de perguntas, dependendo dos objectivos da pesquisa e das características dos inquiridos (Correia e Pardal, 1995).

Com base na classificação apresentada por Correia e Pardal (1995), um questionário pode apresentar diferentes tipos e modalidades de perguntas.

Quanto aos tipos de perguntas (tabela II-3), podemos encontrar no questionário elaborado os seguintes:

- **Perguntas de facto:** Dizem respeito a assuntos concretos, de fácil determinação: sexo, idade, escola onde lecciona, etc;
- **Perguntas explícitas:** Procuram uma informação directa e imediata sobre um assunto;
- **Perguntas de acção:** Referem-se a uma acção realizada;
- **Perguntas de intenção:** Conduzem o inquirido de forma a este revelar a sua atitude face a uma situação que ainda não ocorreu;
- **Perguntas de opinião:** O inquirido expõe a sua opinião perante determinada situação, isto é, o que pensam sobre determinado assunto.

Quanto à modalidade das perguntas, o questionário é constituído por dois tipos de perguntas – fechadas e de escolha múltipla (tabela II-3). As perguntas de **tipo fechado**, devem ser usadas quando se conhece relativamente bem a natureza das variáveis mais relevantes e mais importantes, na área de estudo, e se quer obter informação quantitativa sobre elas (Ghiglione e Matalon, 1992; Correia e Pardal, 1995). Este tipo de

perguntas apresentam a vantagem de facilitar a recolha e posterior tratamento de informação, no entanto podem dar informações pouco ricas, as quais podem conduzir a conclusões demasiado simples e limitam o inquirido à opção por uma de entre as respostas apresentadas.

As **perguntas de escolha múltipla** permitem ao inquirido a escolha de uma ou várias respostas de um conjunto apresentado. A formulação deste tipo de pergunta é bastante diversificada, podendo-se dividir em perguntas de escolha múltipla em leque e perguntas de avaliação ou estimação. As perguntas em leque permitem ao inquirido escolher uma ou várias respostas entre várias alternativas, podendo-lhe ainda ser pedida a ordenação de algumas ou de todas, estas possuem diversas possibilidades de construção, entre as quais se destacam as de leque fechado e as de leque aberto (Correia e Pardal, 1995). Nos questionários elaborados para este estudo foram usadas perguntas em leque aberto.

- **Leque aberto:** o inquirido é posto perante a situação de optar por uma das respostas apresentadas ou acrescentar ele mesmo uma outra (Correia e Pardal, 1995). A pergunta deste modo fica mais aberta e com possibilidades alargadas de recolha de informação.
- **Leque fechado:** o inquirido é colocado perante a situação de optar por uma das várias alternativas de respostas ou ordená-las. Neste caso o inquirido não tem a oportunidade de manifestar a sua opinião fora do quadro de respostas apresentado.
- **Perguntas de avaliação ou estimação:** esta modalidade oferece, como no caso das perguntas em leque fechado, um conjunto de respostas, no qual o inquirido tem como única opção escolher uma das alternativas propostas. No entanto, as perguntas de estimação procuram captar os diversos graus de intensidade face a um determinado assunto, existindo diversos instrumentos de medida para o seu tratamento, tendo desta forma um valor quantitativo (Correia e Pardal, 1995).

As perguntas de avaliação ou de estimação têm várias vantagens: são de resposta simples, possibilitam a concentração do inquirido no problema em estudo, permitem recolher um maior número de dados e facilitam o tratamento dos dados.

O questionário de opiniões elaborado (anexo I) é constituído por 16 questões repartidas em quatro partes distintas:

- Parte I – composta por cinco questões, relativas à caracterização do inquirido;
- Parte II – composta por duas questões sobre o ensino das Ciências em particular da Biotecnologia;
- Parte III – composta por nove questões sobre o Trabalho Prático (laboratorial, experimental e de campo) nas escolas.

Tabela II - 3: Tipos e modalidades das perguntas do questionário

Partes	Pergunta	Tipo de pergunta	Modalidade da pergunta
Caracterização do inquirido	A	Facto	Fechada
	B	Facto	Escolha múltipla em leque fechado
	C	Facto	Escolha múltipla em leque fechado
	D	Explícita	Escolha múltipla em leque fechado
	E	Explícita	Escolha múltipla em leque aberto
Ensino das Ciências	F	Opinião	Escolha múltipla de avaliação ou estimação
	G	Opinião	Escolha múltipla de avaliação ou estimação
Trabalho Prático	H	Acção	Escolha múltipla em leque fechado
	I	Acção	Escolha múltipla de leque aberto
	J	Opinião	Escolha múltipla de avaliação ou estimação
	K	Opinião	Escolha múltipla de avaliação ou estimação
	L	Opinião	Escolha múltipla em leque fechado
	M	Facto	Escolha múltipla em leque fechado
	N	Opinião	Escolha múltipla em leque fechado
	O	Opinião	Aberta
	P	Opinião	Escolha múltipla em leque fechado

4.2. Validação do questionário

O questionário foi validado – validade do conteúdo – por quatro juízes, sendo dois deles investigadores no Ensino Superior, a exercer funções na Universidade de Aveiro, no departamento de Biologia e os dois restantes professores do Ensino Secundário, um deles actualmente a realizar doutoramento em Biologia na temática da transposição de percursos investigativos em Biotecnologia para o ensino secundário, na Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia.

Os juízes analisaram os questionários propondo alterações quer do ponto de vista de estrutura (ordem, apresentação e clareza do enunciado das questões), quer do ponto de vista do conteúdo (adequabilidade das questões dos instrumentos aos objectivos do estudo). Feitas as alterações consideradas convenientes deu-se por concluída a versão final do questionário, o qual se considera ajustado aos inquiridos e capaz de conduzir aos objectivos definidos.

5. Recolha de dados

Os dados foram recolhidos a partir do questionário anteriormente referido. Para a Amostra 1 os questionários foram enviados às respectivas escolas em Fevereiro de 2006, acompanhados de uma carta – anexo II (carta enviada ao Presidente do Conselho Executivo da Escola) e anexo III (carta enviada ao Professor Delegado do 11º Grupo B) – na qual se explicavam os objectivos da investigação, o papel essencial da colaboração solicitada e em que se garantia o anonimato dos inquiridos. Juntamente com os questionários enviou-se também um envelope devidamente endereçado e selado para o reenvio dos questionários preenchidos. Durante o mês de Maio (do mesmo ano) no sentido de maximizar a taxa de recuperação dos questionários, fizeram-se diligências, por via telefónica a duas das escolas que se sabia não terem respondido.

Apesar dos vários procedimentos adoptados de modo a envolver os elementos inquiridos na problemática da investigação e na importância do seu contributo, das 8 escolas duas delas não respondeu ao questionário. A taxa de recuperação de resposta foi, no entanto, positiva. Os professores que não responderam ao questionário, quando contactados telefonicamente, apresentaram como motivos para não responderem a indisponibilidade de tempo.

Os questionários para a amostra 2 foram entregues e respondidos na última sessão da acção de formação (mês de Maio de 2006), sendo que a totalidade dos professores que leccionavam em escolas com ensino secundário responderam ao questionário.

A colaboração às respostas por parte dos professores que se disponibilizaram para tal foi extremamente positiva, demonstrando estes, um grande interesse.

6. Tratamento dos dados

Os dados obtidos no questionário foram previamente compilados em ficheiros de dados de forma a facilitar o respectivo tratamento e análise.

A compilação das respostas foi feita em duas etapas:

ETAPA I – Codificação das respostas às questões, de acordo com o procedimento indicado por (Hill e Hill, 2000) e que consistiu no seguinte:

- Definição do número de variáveis necessárias para representar as respostas a cada uma das questões do questionário, assim como os respectivos nomes;
- Definição da escala de medida ligada a cada variável (escala nominal, escala ordinal ou escala de rácio);

Para o caso de respostas dadas numa escala nominal ou ordinal foram definidas as categorias de resposta alternativas e a respectiva codificação numérica. No primeiro caso atribuíram-se números diferentes às categorias e no segundo atribui-se um conjunto de números consecutivos às categorias de resposta.

- Definição de um valor artificial a considerar no caso de “não resposta” às questões.

As listas com as variáveis definidas para cada questão, do questionário, são apresentadas no anexo IV.

ETAPA II – Criação das tabelas e inserção dos valores das variáveis de cada questão (a tabela com a codificação dos dados, criada na folha de cálculo Microsoft Excel®, encontra-se no anexo V).

O tratamento e análise das respostas foram realizados de acordo com a especificidade de cada questão. Em algumas questões, os dados recolhidos foram analisados do ponto de vista quantitativo pelo cálculo da percentagem das respostas dadas a cada questão; noutras a análise foi fundamentalmente qualitativa, consistindo principalmente na identificação das respostas dadas pelos inquiridos, procedendo-se à sua categorização.

Relativamente à apresentação dos dados obtidos nas questões de natureza fechada, foi privilegiada a utilização de quadros, por apresentarem, como afirmam Hill e Hill (2000) a vantagem de poder concentrar, num pequeno espaço, informação detalhada e relevante.

Quanto às respostas dadas nas restantes questões, estas foram transcritas e os resultados foram apresentados na forma de gráficos de barras. A opção por esta forma de apresentação, apesar da sua contribuição, quer para a grande dimensão do capítulo de apresentação e análise de dados, quer para o elevado número de gráficos existente no trabalho, teve como objectivo facilitar a leitura integral dos resultados.

Capítulo III
Revisão da literatura

1. Introdução

Neste capítulo pretende-se descrever as temáticas que se encontram relacionadas com as actividades laboratoriais que foram objecto de estudo nesta dissertação. Fez-se, desta forma, a recolha da informação teórica relativa ao estudo, organizada tendo em conta o programa de Biologia do 12º ano de escolaridade:

- Biotecnologia e as suas aplicações
- Biotecnologia Microbiana: os microrganismos e a sua importância
- A Biotecnologia na terapêutica de doenças: produção de antibióticos
- Microrganismos e a indústria: actividade enzimática
- Etapas de um processo industrial de Biotecnologia Microbiana

2. Biotecnologia e as suas aplicações

A “European Federation of Biotechnology” (1994) propõe a seguinte definição: “Biotecnologia é a integração das Ciências Naturais e das Ciências de Engenharia com vista à aplicação industrial de organismos, células, partes destas e análogos moleculares para a obtenção de produtos e serviços” (Ferreira e Sousa, 1998). Sendo assim, a Biotecnologia é uma área científico-tecnológica que promove a aplicação do conhecimento científico e tecnológico no processamento de materiais recorrendo à utilização de agentes biológicos, para promover bens e assegurar serviços. Os agentes biológicos podem ser células microbianas, animais e vegetais; entendendo-se por bens, qualquer produto industrial relacionado com a alimentação, a medicina, a agricultura, os produtos químicos, a energia, entre outros. Os serviços envolvem, por exemplo, a purificação de águas, tratamento de resíduos, controlo da poluição, ou seja, serviços relacionados com a sustentabilidade mundial. (Lima e Mota, 2003). A Biotecnologia é desta forma, um campo de trabalho multidisciplinar.

As áreas que se relacionam com a Biotecnologia pertencem a diversos sectores da Ciência e Tecnologia tais como: a Microbiologia, a Biologia Molecular, a Fisiologia, a Engenharia Química, a Engenharia Ambiental, etc.

A Biotecnologia é muitas vezes considerada uma Ciência recente, contudo os processos biotecnológicos são já utilizados desde a antiguidade. A utilização da Biotecnologia teve o seu início com os processos fermentativos, na produção de bebidas alcoólicas antes do ano 6.000 a.C. Mais tarde, por volta do ano 2000a.C., os egípcios, que já utilizavam o fermento para fabricar cerveja, passaram a utilizá-lo também para a produção de pão. Outras aplicações como a produção de vinagre, iogurte e queijos são utilizadas há vários séculos (Lima e Mota, 2003).

A descoberta da penicilina por Alexandre Fleming foi um grande marco na produção de antibióticos, a partir de 1928, vários antibióticos foram descobertos. Durante a segunda guerra mundial, os antibióticos passaram a integrar os processos industriais fermentativos baseando-se inicialmente na síntese da penicilina e, posteriormente, da estreptomicina (Lima e Mota, 2003; Waites *et al*, 2001). Foi no entanto, a partir da década de 50 que a Biotecnologia, com a descoberta da síntese química do ADN, e com as técnicas de manipulação genética, tais como, a técnica do ADN recombinante, da fusão celular ou hibridoma, passou a ser considerada como tal.

É importante salientar que, a maioria dos avanços da Biotecnologia resultam das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos. A diversidade genética e metabólica dos microrganismos é estudada desde há muitos anos, com o objectivo de obter produtos biotecnológicos (Tabela III.1), tais como, a já referida produção de antibióticos (estreptomicina, penicilina, etc.), o processamento de alimentos (queijo, iogurte, vinagre, etc.), as bebidas alcoólicas (vinho, cerveja, etc.), os ácidos orgânicos (por exemplo o ácido cítrico), os álcoois (etanol), os alimentos fermentados (molho de soja), o tratamento e remediação de resíduos (esgotos domésticos e industriais), e a agricultura, na fertilização de solos (fixação biológica de azoto) e controlo biológico de pragas e doenças (controlo da lagarta da soja, de fitopatogénicos como *Rhizoctonia*, entre outros) (Madigan *et al*, 2000; Waites *et al*, 2001).

Tabela III.1: Produtos obtidos por processos biotecnológicos (adaptado de Waites *et al*, 2001)

Alimentos, Bebidas, Suplementos e aditivos alimentares
<ol style="list-style-type: none"> 1. Produtos derivados do leite por fermentação mediante bactérias lácticas (queijo, iogurte) 2. Bebidas alcoólicas (vinho, cerveja) e produtos de destilação de bebidas alcoólicas (brandy, whisky, vodka) 3. Pão e derivados 4. Vitaminas: ácido ascórbico (vitamina C), riboflavina, vitamina B₁₂ 5. Aminoácidos: ácido glutâmico, lisina, triptófano, glicina 6. Proteínas celulares (SCP, "single cell protein" como suplemento alimentar)
Produtos medicinais
<ol style="list-style-type: none"> 1. Antibióticos 2. Proteínas reguladoras do metabolismo (hormona de crescimento, insulina) 3. Factores de coagulação sanguínea 4. Proteínas e enzimas 5. Enzimas de restrição 6. Esteróis 7. Vacinas

Enzimas industriais
1. Enzimas hidrolíticas: proteases, lipases e celulasas para detergentes. Amilases, xilanasas. 2. Glucose isomerase
Produtos químicos industriais
1. Alcoóis: Etanol e metanol 2. Acetona 3. Polissacarídeos 4. Combustíveis: etanol, metano, hidrogénio, propano, butano. 5. Matérias-primas para o fabrico de plásticos

3. Biotecnologia Microbiana: os microrganismos e a sua importância

Os microrganismos são utilizados em processos de interesse comercial e estão na base da indústria biotecnológica. A diversidade metabólica e nutricional destes seres vivos, aliada à capacidade de se reproduzirem rapidamente, produzindo compostos de grande aplicação e valor, confere-lhes um lugar privilegiado na Biotecnologia. A possibilidade de alterar as características naturais do microrganismo ampliou as aplicações em áreas relacionadas com a saúde, agricultura, energia ou ambiente (Lima e Mota, 2003).

A Biotecnologia Microbiana visa a produção de bens e serviços utilizando a capacidade dos microrganismos de sintetizarem diversos produtos de interesse para o Homem. Podemos distinguir três grandes marcos na evolução das aplicações dos microrganismos em processos com interesse comercial, na designada Biotecnologia Microbiana (Lima e Mota, 2003; Waites *et al*, 2001; Leveau e Bouix, 2000).

- Em meados do século XIX, Pasteur evidencia o papel das leveduras e bactérias na fermentação alcoólica e láctica, respectivamente;
- A utilização de culturas puras e o isolamento de variantes mais eficientes das estirpes microbianas originalmente usadas conduziu, no início do século XX, à introdução de técnicas de assépsia e a um controlo mais rigoroso do processo industrial;
- Com o aparecimento das tecnologias do ADN recombinante e de Biologia Molecular (por exemplo, com produção de anticorpos monoclonais), no último quarto do século XX, iniciou-se um grande desenvolvimento qualitativo da Biotecnologia Microbiana.

3.1. Microrganismos com interesse industrial

Os microrganismos são, actualmente, utilizados como modelos de seres vivos mais complexos. Estes são preferidos às plantas e aos animais em processos industriais, pois são organismos unicelulares, ou pluricelulares

mas pouco diferenciados, o que facilita a sua manipulação e manutenção em laboratório (Madigan *et al*, 2000; Lima e Mota, 2003).

Os microrganismos de maior importância industrial pertencem a dois grandes grupos: os fungos (incluindo leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, e fungos filamentosos, como *Aspergillus*) e eubactérias (incluindo Gram negativas, como *Escherichia coli*, e Gram positivas filamentosas, como os Actinomicetes, ou não filamentosas, como *Bacillus*) (Lima e Mota, 2003; Madigan *et al*, 2000).

A utilização industrial de microrganismos visa a produção da própria biomassa, como por exemplo, a levedura na panificação ou as bactérias utilizadas em culturas para a produção de lacticínios; e a produção de metabolitos como é o exemplo das enzimas, do etanol e dos antibióticos (Madigan *et al*, 2000).

3.2. Características biológicas do microrganismo

Todos os organismos vivos são constituídos por células, estas correspondem a estruturas organizadas, que apresentam um metabolismo próprio. Ou seja, as células são capazes de captar substâncias químicas do meio ambiente, transformando-as e conservando parte da sua energia numa forma que possa ser utilizada, e posteriormente excretando os produtos finais desse processo (Robertis e Robertis, 1996; Madigan *et al*, 2000).

Podemos encontrar microrganismos procariotas e microrganismos eucariotas. Os microrganismos procariotas, os quais são relevantes para este trabalho, são caracterizados por terem uma organização celular muito simples. Os microrganismos eucariotas (fungos, algas e protozoários) podem ser unicelulares e pluricelulares, têm uma organização mais complexa e organelos diferenciados.

A maioria dos microrganismos procariotas, após a replicação do seu material genético, dividem-se por fissão binária, podendo assim apresentar, segundo os planos de divisão celular, diversas formas (cocos, bacilos, entre outras) e agrupamentos (isolados, aos pares, em cadeias, em cachos, em tétradas) (Ferreira e Sousa, 1998; Madigan *et al*, 2000).

3.2.1. Principais habitats microbianos

Os habitats dos microrganismos são extremamente diversos (desde habitats que permita o crescimento de organismos superiores até habitats completamente hostis a estes).

Tal como em laboratório, o crescimento de microrganismos na natureza depende de diversos factores (por exemplo, a presença de determinado composto químico) e características ambientais (Tabela III.2). As diferenças nos tipos e quantidades dos vários factores, assim como as condições físico-químicas de um habitat, definem o nicho de cada microrganismo em particular (Madigan *et al*, 2000).

Tabela III.2: Principais compostos e condições necessárias no crescimento microbiano na natureza (*in* Madigan *et al*, 2000)

Compostos	Condições
Carbono (orgânico, CO ₂)	Temperatura: frio → ameno → quente
Nitrogénio (orgânico, inorgânico)	Potencial de água: seco → húmido → molhado
Outros macronutrientes (S, P, K, Mg)	pH: 0 → 7 → 14
Micronutrientes (Fe, Mn, Co, Zn, Ni)	O ₂ → baixas tensões de O ₂ → anóxico
O ₂ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Fe ³⁺ , etc	Luz: intensa → suave → escuro
Dadores de electrões inorgânicos (H ₂ , H ₂ S, Fe ²⁺ , NH ₄ ⁺ , NO ₂ ⁻ , etc)	Condições osmóticas: água doce → água salgada → água hipersalina

Em Microbiologia, quando se caracteriza um habitat utiliza-se o termo microambiente (local onde um microrganismo vive). Numa partícula de solo, por exemplo, estão presentes diferentes microambientes diferenciados química e fisicamente.

**Figura III – 1:** Agregado de solo formado por componentes minerais e orgânicos, indicando a localização de microrganismos do solo organizados em micro-colónias (*in* Madigan *et al*, 2000).

Além dos diferentes factores e condições de um habitat referidos, existe também o factor de competição entre os microrganismos presentes. Um determinado habitat possui uma mistura de diferentes organismos, sendo a densidade de cada população dependente do grau de semelhança do habitat em relação ao nicho primário (Madigan *et al*, 2000).

Entre os habitats microbianos podem-se salientar os habitats terrestres, os solos e a água doce (rios, lagos, lagoas), os habitats marinhos (regiões oceânicas litorais, mar aberto, mar profundo), as fendas hidrotermais e as águas superaquecidas (fumarolas e montes marinhos). Neste trabalho será somente feita uma abordagem a um dos principais habitats: o solo, que irá constituir o ambiente a partir do qual serão isolados os microrganismos em estudo.

O solo é composto por matéria mineral, raízes de plantas, biomassa microbiana e animal, matéria orgânica em vários graus de decomposição, assim como por água e uma atmosfera gasosa. É o habitat de uma

larga gama de organismos que desempenham uma enorme variedade de funções e cujas actividades são condicionadas pelas suas propriedades físicas e químicas. Alguns destes organismos contribuem directamente para a fertilidade do solo, com a fixação do azoto atmosférico ou da solubilização de fosfatos a formas utilizáveis pelas plantas e outros organismos. Outros, produzindo polissacarídeos, por exemplo, contribuem para a manutenção da estrutura do solo (Ferreira e Sousa, 1998; Kirka *et al*, 2004; Prosser, 2002).

A ocorrência de microrganismos no solo depende de diversos factores ambientais, tais como, o tipo de solo, a profundidade, a temperatura e o regime hídrico. O crescimento de microrganismo é mais intenso nas superfícies das partículas do solo, geralmente na rizosfera.

As avaliações quantitativas da micropopulação do solo são difíceis e limitadas devido à enorme diversidade de microrganismos que habitam neste. Estima-se que, somente, 1% dos microrganismos do solo tenham sido identificados. Factores, como a disponibilidade de fontes de carbono e energia adequadas, assim como de outros nutrientes, determinam a abundância de microrganismos num dado local (Ferreira e Sousa, 1998).

Os microrganismos do solo incluem bactérias, fungos, protozoários e algas (tabela III.3).

Tabela III.3: Biomassa e números aproximados de microbiota de um solo fértil (*in* Ferreira e Sousa, 1998)

Organismos	Número/g	Biomassa (Kg/ha)
Bactérias	10^8 - 10^9	300-3000
Actinomicetes	10^7 - 10^8	300-3000
Fungos	10^5 - 10^6	500-5000
Microalgas	10^3 - 10^6	10-1500
Protozoários	10^3 - 10^5	5-200

A maioria das bactérias do solo pertence a espécies de *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter* e *Nitrobacter*. Estes, para além de serem muito abundantes, apresentam geralmente forma de bastonetes esporulados.

Os actinomicetes, bactérias filamentosas, são importantes pela abundância e pelo papel que desempenham na decomposição de substratos (por exemplo, a celulose, a quitina, a lenhina) e na síntese de antibióticos e enzimas extracelulares (géneros *Nocardia*, *Streptomyces*, e *Micromonospora*) (Ferreira e Sousa, 1998, Ballows *et al*, 1970).

O número e proporção de actinomicetes na microflora do solo dependem de numerosos factores, tais como, a natureza e a abundância de materiais orgânicos. Por exemplo, a introdução de adubo leva ao aumento do número de actinomicetes, a adição de cultivos de actinomicetes a solos ricos em matéria orgânica acelera a decomposição de resíduos vegetais.

A profundidade entre 2 e 15cm é geralmente a profundidade óptima para a recolha de amostras de actinomicetes. Este número diminui com a profundidade, sendo o pH óptimo entre 7 e 8. A maior parte dos actinomicetes são aeróbios e preferem taxas de humidade pouco elevadas, da ordem dos 10 a 30% (Leveau e Bouix, 2000; Ballows *et al*, 1970).

As cianobactérias e algas, sendo fotoautotróficas, encontram-se na camada superficial do solo, onde dispõem de luz solar, e desempenham um papel ecológico fundamental como colonizadores primários (Ferreira e Sousa, 1998).

Quanto à biomassa, os fungos são geralmente os que predominam entre os microrganismos do solo, podem ser simbioses em plantas, patogénicos de plantas e animais, embora o papel mais importante no solo seja a decomposição da matéria orgânica. No solo, os fungos mais comuns pertencem aos géneros *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* (Ferreira e Sousa, 1998).

Como já referido, entre os microrganismos do solo encontramos também os protozoários. Os protozoários são predominantemente heterotróficos, estando a sua abundância largamente dependente da presença de outros microrganismos (nutrição fagotrófica) e condições de humidade do solo (Ferreira e Sousa, 1998).

3.2.2. Nutrição microbiana

O crescimento de qualquer organismo vivo é um processo dinâmico, o qual requer energia e nutrientes para a síntese dos componentes e manutenção celular. Os microrganismos são os mais versáteis e diversificados nas suas exigências nutricionais (Ferreira e Sousa, 1998).

A nutrição microbiana pode ser definida como um mecanismo que fornece às células os nutrientes necessários à síntese de diversos monómeros (Madigan *et al*, 2000). Organismos distintos requerem diferentes conjuntos de nutrientes, não sendo todos necessários nas mesmas quantidades, desta forma, distinguem-se os macronutrientes (Tabela III.4) (nutrientes que são exigidos em quantidades relativamente elevadas e que desempenham papéis fundamentais na estrutura e metabolismo da célula) e os micronutrientes ou elementos traço (Tabela III.5) (nutrientes exigidos em menores quantidades mas funcionalmente muito importantes, essenciais para a actividade de certas enzimas, funcionando muitos deles como cofactores).

Tabela III.4: Macronutrientes encontrados na natureza e em meios de cultura (*in* Madigan *et al*, 2000)

Elemento	Forma do nutriente, encontrada na natureza	Forma química, fornecida nos meios de cultura
Carbono (C)	CO ₂ , compostos orgânicos	Glucose, malato, acetato, piruvato, aminoácidos, outros compostos ou misturas complexas (extracto de levedura, peptona, etc)
Hidrogénio (H)	H ₂ O, compostos orgânicos	H ₂ O, compostos orgânicos
Oxigénio (O)	H ₂ O, O ₂ , compostos orgânicos	H ₂ O, O ₂ , compostos orgânicos
Azoto (N)	NH ₃ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , compostos orgânicos azotados	Inorgânico: NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂ Orgânico: aminoácidos, bases azotadas dos nucleótidos e muitos outros compostos com azoto
Fósforo (P)	PO ₄ ³⁻	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
Enxofre (S)	H ₂ S, SO ₄ ²⁻ , compostos orgânicos sulfurados, sulfetos metálicos (FeS, CuS, ZnS, NiS, etc.	Na ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, cisteína e outros compostos orgânicos sulfurados
Potássio (K)	K ⁺ em solução ou em vários sais de K	KCl, KH ₂ PO ₄
Magnésio (Mg)	Mg ³⁺ em solução ou em vários sais de Mg	MgCl ₂ , MgSO ₄
Sódio (Na)	Na ⁺ em solução como NaCl ou outros sais de Na	NaCl
Cálcio (Ca)	Ca ²⁺ em solução, como CaSO ₄ , ou outros sais de Ca	CaCl ₂
Ferro (Fe)	Fe ²⁺ ou Fe ³⁺ em solução, como FeS, Fe(OH) ₃ ou muitos outros sais de Fe	FeCl ₃ , FeSO ₄ , e outras soluções com ferro

Tabela III- 5: Micronutrientes (elementos traços) necessários aos seres vivos (*in* Madigan *et al*, 2000)

Elemento	Função celular
Crómio (Cr)	Requerido por mamíferos no metabolismo da glucose, os microrganismos não o necessitam
Cobalto (Co)	Vitamina B ₁₂ , transcarboxilase (bactérias que metabolizam ácido propiónico)
Cobre (Cu)	Respiração; citocromo c oxidase, fotossíntese, plastocianina e alguns superóxidos dismutases
Manganésio (Mn)	Activador de muitas enzimas, presente em certas superóxido dismutases e na enzima que cliva a água, (fotossistema II)
Molibdénio (Mo)	Certas enzimas, contendo flavina, azotases, nitrato redutase, sulfito oxidase e algumas desidrogenases
Níquel (Ni)	Maioria das hidrogenases; coenzimas F ₄₃₀ de metanogénicos, monóxido de carbono desidrogenase, urease
Selénio (Se)	Desidrogenases, algumas hidrogenases, no aminoácido selenocisteína
Tungsténio (W)	Algumas desidrogenases, oxotransferases de hipertermófilos
Vanádio (V)	Vanádio nitrogenase, bromoperoxidase
Zinco (Zn)	Anidrase carbónica, álcool desidrogenase, ARN e ADN polimerases e muitas proteínas de ligação ao ADN
Ferro (Fe) (necessário em maiores quantidades)	Citocromos, catalases, peroxidases, proteínas contendo ferro e enxofre, oxigenases, todas as nitrogenases.

As exigências de nutrientes dependem do microrganismo em questão. O carbono, por exemplo, é um dos elementos mais importantes, todos os organismos necessitam de carbono, embora os microrganismos sejam extremamente diversificados quanto ao tipo e quantidade de compostos que podem utilizar.

Os microrganismos que utilizam carbono orgânico como principal fonte de carbono, são designados heterotróficos, e os que utilizam CO₂ como principal fonte de carbono são designados de autotróficos. Alguns microrganismos são capazes de utilizar carbono orgânico ou carbono inorgânico, sendo designados por autotróficos facultativos. No entanto, estas categorias são insuficientes para abranger a diversidade dos padrões nutricionais dos microrganismos. Podemos, assim, considerar várias categorias nutricionais (Ferreira e Sousa, 1998, Madigan *et al*, 2000), tal como se encontra na tabela seguinte (Tabela III.6).

Tabela III.6: Categorias nutricionais de organismos numa classificação que combina a natureza das fontes de carbono e de energia (Ferreira e Sousa, 1998).

Categorias nutricionais	Fonte de carbono	Fonte de energia	Organismos (exemplos)
Fotoautotrófico	CO ₂	Luz	Algas, bactérias fotossintéticas
Fotoheterotrófico	Compostos orgânicos	Luz	Bactérias fotossintéticas, arqueobactérias halófilas
Quimiofotoautotrófico	CO ₂	Inorgânica	Eubactérias nitrificantes e oxidantes do enxofre
Quimiofotoheterotrófico	Compostos orgânicos	Inorgânica	Algumas arqueobactérias metanogénicas
Quimioorganoautotrófico	CO ₂	Orgânica	Eubactérias metilotróficas autotróficas
Quimioorganoheterotrófico	Compostos orgânicos	Orgânica	Fungos, protozoários e a maior parte das eubactérias

3.2.3. Crescimento microbiano

O crescimento corresponde a um componente essencial da função microbiana, já que todas as células apresentam tempo de vida definido na natureza (Madigan *et al*, 2000).

O conhecimento de como as populações microbianas crescem é de grande utilidade no desenvolvimento de métodos de controlo deste mesmo crescimento. O crescimento microbiano pode ser definido como sendo o aumento dos componentes celulares, que resulta num aumento de tamanho e posteriormente na divisão celular. Contudo, há também a considerar que nem sempre existe um aumento do número de células pois, por exemplo, quando um microrganismo acumula substâncias de reserva (glicogénio ou poli β-hidroxibutirato) não existe divisão celular mas sim aumento da biomassa. Nesta situação o número de células mantém-se observando-se um aumento contínuo de biomassa (Waites *et al*, 2001). Ou seja, o crescimento microbiano pode ser definido como o aumento do número de células e/ou como o aumento de massa microbiana, a biomassa.

A taxa de crescimento corresponde à variação do número de células ou da biomassa por unidade de tempo. Durante um ciclo de divisão celular, todos os componentes estruturais de uma célula são duplicados. O tempo que uma célula leva a originar duas novas células é designado de tempo de geração ou de duplicação. Os tempos de geração variam entre os diferentes organismos, muitos microrganismos têm um tempo de geração de 20 minutos a 3 horas, como por exemplo em *E. coli*, enquanto outros podem demorar vários dias. O tempo de geração, no entanto, depende das condições ambientais e nutricionais em que o microrganismo se encontra.

Se houver N_0 células viáveis no tempo inicial, então, após uma geração haverá $2N_0$ células e estas darão origem a 2^2N_0 . Após n gerações, o número de células será:

$$N_t = 2^n N_0; \text{ onde } N_t \text{ é o número final de células.}$$

Se a população estiver a crescer durante o tempo t , então:

$$n = t/t_d;$$

A este tipo de aumento designa-se crescimento exponencial, o qual é um padrão de aumento populacional, em que o número de células é duplicado a cada período de tempo (Ferreira e Sousa, 1998, Madigan *et al*, 2000; Waites *et al*, 2001). O crescimento exponencial caracteriza-se por apresentar inicialmente uma taxa lenta do aumento no número de células que é posteriormente acelerada.

O crescimento exponencial representa uma das fases típicas da vida de um microrganismo, pois o ciclo de crescimento microbiano é mais complexo. Este pode incluir quatro fases distintas: fase lag ou latência, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte ou de declínio. Alguns autores consideram mais duas fases, embora com um período geralmente reduzido. São estas a fase log ou logarítmica entre a fase lag e a fase exponencial e a fase de desaceleração que ocorre no final da fase exponencial, momentos antes do início da fase estacionária (Ferreira e Sousa, 1998; Waites *et al*, 2001).

O crescimento microbiano é estudado pelo método da cultura em descontinuo ou sistema fechado ou "batch". Se inocularmos num meio de cultura líquido, com condições químicas e físicas favoráveis, uma população viável de microrganismos e seguirmos o seu crescimento ao longo do tempo obter-se-á uma curva com as várias fases de crescimento características dessa população microbiana num sistema fechado (figura III.2).

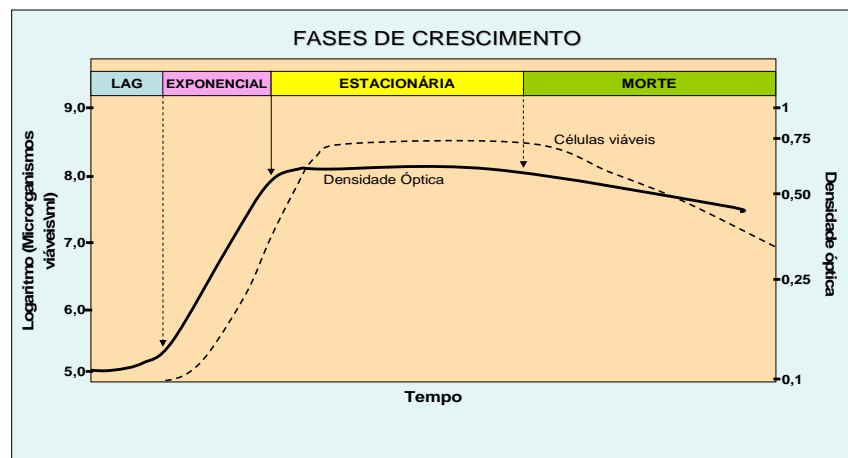


Figura III – 2: Curva de crescimento típica de uma população bacteriana (adaptado de http://wps.prenhall.com/esm_madigan_brockbio_10)

Durante a fase lag o microorganismo adapta-se ao meio, o crescimento não se inicia de imediato, existe um período que poderá ser mais ou menos longo, dependendo do microorganismo em causa e condições de cultivo, as células necessitarão de tempo para adaptar o seu metabolismo, havendo para isso uma intensa actividade metabólica.

Se uma cultura em crescimento exponencial for inoculada num mesmo meio, nas mesmas condições de cultivo, a fase lag não irá ocorrer, havendo o estabelecimento imediato de um crescimento exponencial (Madigan *et al*, 2000).

À fase lag segue-se um curto período de aceleração e a população entra numa fase de crescimento constante, esta fase é a designada fase log ou logarítmica.

A fase exponencial, como já foi referido, corresponde à fase de duplicação do número de células ou biomassa num determinado período de tempo. As células em crescimento exponencial, geralmente, encontram-se mais saudáveis e resistentes, pois apresentam-se plenamente adaptadas às condições químicas e físicas do meio em que se encontram. Por essa razão, células que se encontram na metade da sua fase exponencial de crescimento são frequentemente utilizadas para a produção de metabolitos ou outros componentes celulares. A taxa de crescimento exponencial é influenciada pelas condições ambientais (como por exemplo, a temperatura e a composição do meio de cultura) e pelas características genéticas do próprio organismo (Madigan *et al*, 2000).

Eventualmente ao longo do tempo, a concentração de determinados nutrientes torna-se limitante, levando ao declínio na taxa de crescimento, dando-se início à fase de desaceleração. A taxa de crescimento do

microrganismo continua em declínio, fase estacionária, até que todo o substrato limitante seja metabolizado. Quando, o crescimento, deixa de ser sustentável (esgotamento de nutrientes e/ou acumulação de produtos inibitórios do metabolismo), as células iniciam a fase de declínio ou morte. Alguns dos microrganismos podem sobreviver longos períodos de tempo sem a perda da viabilidade, usando as suas reservas endógenas, enquanto que outros começam a morrer, logo que entram na fase estacionária, levando a taxa de crescimento a zero.

Embora na fase estacionária normalmente não ocorra crescimento, muitas funções celulares podem ainda estar activas, inclusive o metabolismo energético e alguns processos biossintéticos. É nesta fase que alguns microrganismos produzem esporos com o objectivo de garantirem a sua sobrevivência.

A fase de morte ocorre após a fase estacionária, devido a efeitos de metabolitos tóxicos, ou à autólise das células por enzimas líticas. A morte é também, uma função exponencial e diminui com o tempo, no entanto, a taxa de morte celular é inferior à taxa de crescimento exponencial.

Alguns dos produtos dos microrganismos são produzidos durante a sua fase de crescimento activo os designados produtos de metabolismo primário, nomeadamente, os aminoácidos, as vitaminas, os ácidos orgânicos, os solventes como o etanol. Outros produtos formam-se numa fase posterior quando o organismo está em fase estacionária. Estes são referidos como metabolitos secundários, e têm grande importância industrial, de que são exemplo os antibióticos, os alcalóides entre outros (Waites *et al*, 2001).

Os microrganismos caracterizam-se pela sua grande diversidade metabólica e capacidade de adaptação a diferentes condições ecológicas. É por isso, fundamental ter conhecimento do modo como a taxa de crescimento pode ser afectada pelos diferentes parâmetros e os mecanismos pelos quais as células respondem ou se adaptam a condições desfavoráveis, para assim ser possível o seu controlo (Ferreira e Sousa, 1998).

Diversos factores afectam o crescimento microbiano (Ferreira e Sousa, 1998; Madigan *et al*, 2000; Waites *et al*, 2001):

- Concentração de nutrientes: a quantidade e tipo de nutrientes a que determinado microrganismo tem acesso, influencia o modo como esse irá crescer. Desta forma, a taxa específica de crescimento microbiano é uma função da concentração de nutrientes presentes no meio de cultura.
- Temperatura: um dos factores mais importantes no crescimento e sobrevivência dos microrganismos (Ferreira e Sousa, 1998). Com o aumento da temperatura as reacções químicas tendem a acelerar, no entanto, existem limites para os quais as macromoléculas com actividade biológica perdem a sua estrutura e funcionalidade. Da mesma forma que temperaturas demasiado baixas impedem o bom funcionamento das membranas e detêm o metabolismo.

Cada organismo tem valores precisos de temperatura máxima e mínima que permitem o seu crescimento e de temperatura ótima, à qual é máxima a sua taxa de crescimento. A gama de temperaturas que permitem o crescimento dos microrganismos varia, sendo que estes podem ser agrupados em quatro grupos: os psicrófilos (0 a 20°C), os mesófilos (12 a 45°C), os termófilos (42 a 68°C) e os hipertermófilos (80 a 113°C) (Ferreira e Sousa, 1998; Madigan *et al*, 2000).

- pH: cada organismo possui um valor de pH ótimo, situado entre uma gama de valores que permitem o crescimento do microrganismo. Os microrganismos que preferem pHs próximos de 7 são designados de neutrófilos. No entanto, existem microrganismos, embora em número mais reduzido, que crescem em pHs ácidos (1,0 a 5,5), os acidófilos, e pHs alcalinos (8,5 a 11,5), os denominados alcalófilos (Ferreira e Sousa, 1998; Madigan *et al*, 2000).
- Actividade da água, a_w : é outro factor de grande influência no crescimento microbiano. A a_w corresponde à razão entre a pressão de vapor do ar em equilíbrio com uma substância ou solução em relação à pressão de vapor de água pura, os seus valores variam entre 0 e 1 (Campos, 2002; Madigan *et al*, 2000). Os microrganismos diferem, tal como os restantes organismos, na sua capacidade para se adaptarem a determinada a_w , estando organizados em diferentes grupos (halotolerantes, halófilos, halófilos extremos) dependendo das suas adaptações.
- Presença ou ausência de oxigénio: a tensão de oxigénio é extremamente importante no desenvolvimento dos microrganismos, estes são classificados como aeróbios estritos, anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos, aerotolerantes e microaerófilos (requerem concentrações muito baixas de O_2).

Quando o crescimento é equilibrado qualquer constituinte da biomassa pode ser medido, para calcular a taxa específica de crescimento. Como medidas do crescimento microbiano temos os métodos directos (contagem total de células, contagem de viáveis) e os métodos indirectos (medição da turbidez, análises químicas).

3.2.4. Genoma microbiano

As funções de uma célula estão codificadas no ácido desoxirribonucleico (ADN). O conjunto de toda a informação codificada no ADN de uma célula denomina-se genótipo. A informação armazenada no ADN específica, em geral, a sequência de uma proteína a partir de uma macromolécula intermediária, o ácido ribonucleico (ARN).

Nos organismos procariotas não existe núcleo, nem outros verdadeiros organelos, geralmente existe uma só molécula de ADN de cadeia dupla circular, que se encontra compactada num aglomerado denso, o nucleóide,

o qual se destrói se a célula sofrer lise. Nos organismos eucariotas, o ADN existe no núcleo bem diferenciado, separado dos restantes organelos por sistemas de membranas, nestes organismos, o ADN é constituído por várias moléculas, associadas a proteínas, as histonas. A maior parte do ADN encontra-se nos cromossomas do núcleo, embora também estejam presentes nas mitocondrias e nos cloroplastos.

Os processos moleculares subjacentes ao fluxo da informação genética podem ser divididos em três fases (Videira, 2001; Robertis e Robertis, 1996):

- Replicação: durante esta fase obtêm-se réplicas de ADN, cada molécula de ADN dá origem a duas moléculas idênticas. O mecanismo da replicação depende da complementaridade entre as moléculas de ADN e de interações específicas entre proteínas e determinadas sequências de ADN.
- Transcrição: o ADN não participa directamente na síntese proteica, havendo um intermediário de ARN. A transferência da informação para ARN é denominada de transcrição, a molécula de ARN que contém a informação que codifica a proteína é o ARN mensageiro (ARNm). Algumas regiões do ADN transcritas não codificam proteínas, mas sim outros tipos de ARN – ARN de transferência (ARNt) e o ARN ribossomal (ARNr).
- Tradução: uma sequência específica de aminoácidos em cada proteína é determinada por uma sequência específica de bases de ARNm (transcrito a partir do ADN). Três bases no ARNm, o códon, codificam para um único aminoácido. Este código genético é traduzido em proteínas por um mecanismo denominado síntese proteica. Esta é levada a cabo por um complexo constituído por ribossomas (compostos de proteínas e ARNr), ARNt e várias enzimas.

A transferência da informação contida na sequência do ácido nucléico até à proteína é unidireccional, isto é, a sequência de uma proteína não especifica a sequência de um ácido nucléico. Esta transferência unidireccional é muitas vezes designada de Dogma Central, pois é válida para todas as formas de vida do nosso planeta (Madigan *et al*, 2000).

A replicação, a transcrição e a tradução ocorrem em todos os seres celulares. Existem, no entanto, algumas diferenças nos mecanismos pelos quais esses processos ocorrem em procariotas e eucariotas. Estas diferenças devem-se essencialmente à organização distinta da informação genética.

Um segmento de ADN que determine a síntese de uma molécula de ARN estável (ARNs de transferência e ribossomais) ou a síntese de proteínas é designado por gene – unidade funcional da informação genética – ou seja, um gene corresponde ao elemento informacional que especifica a sequência de aminoácidos que compõe cada proteína. Os genes representam a informação armazenada, enquanto as proteínas correspondem às entidades funcionais da célula (Madigan *et al*, 2000).

Nos genes que codificam proteínas encontram-se algumas sequências funcionais: a região promotora ou reguladora, onde a ARN polimerase se liga para iniciar a transcrição, está localizada a montante da região codificante. A região promotora tem um papel fundamental na regulação da síntese de ARN mensageiro (ARNm).

Nos procariotas os genes são habitualmente segmentos contínuos de ADN (embora haja algumas excepções) (figura III.3). Nestes, a região promotora ou reguladora, onde se inicia a transcrição, assegura que o gene é transcrito no local correcto e no momento certo. Os sinais de activação são transformados em proteínas reguladoras que se ligam à região promotora do gene e iniciam a transcrição da região codificante adjacente. A região codificante é contínua (não contém segmentos não codificantes intercalados) (Griffiths *et al*, 2000). Enquanto que nos eucariotas a maior parte dos genes são descontínuos, tipo mosaico, contendo regiões não codificantes (intrões) no interior das regiões codificantes (exões) (Ferreira e Sousa, 1998; Griffiths *et al*, 2000). Tanto os intrões como os exões são transcritos, originando um transcrito primário ou pré-ARNm, o qual originará o ARNm funcional após a remoção das regiões não codificantes (figura III.4).

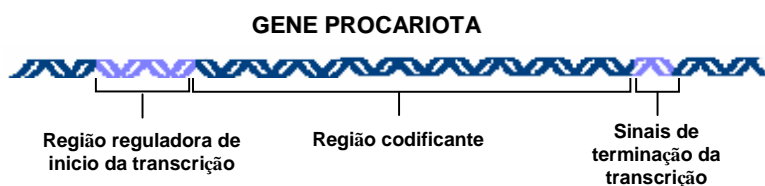


Figura III – 3: Esquema da estrutura de um gene procariota

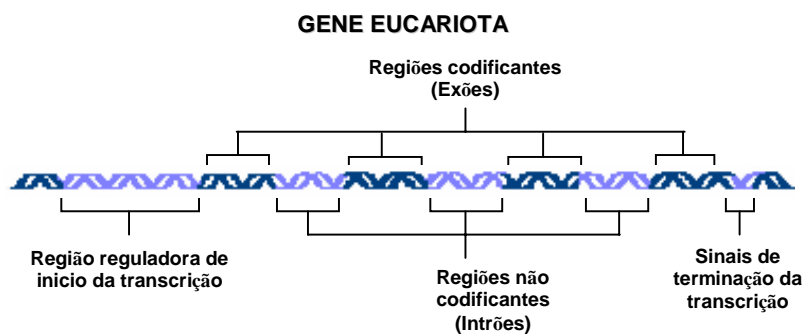


Figura III – 4: Esquema da estrutura de um gene eucariota

3.2.5. Regulação da expressão génica

As características fenóticas de um microrganismo são determinadas pelo seu genótipo e por determinadas condições ambientais. Cada grupo de microrganismos está adaptado a uma ampla gama de condições ambientais (temperatura, pH, concentração de oxigénio, disponibilidade de nutrientes, compostos

tóxicos, etc) que lhe proporcionam condições ideais para o seu crescimento, e permitem uma maior taxa de sobrevivência.

As alterações das condições ambientais requerem, por parte do microrganismo, uma adaptação para que se assegure a sobrevivência nas novas condições. Desta forma, o microrganismo deverá produzir um componente estrutural ou funcional que lhe assegure a sobrevivência. A produção de novos componentes requer a expressão de genes que não estavam a ser transcritos, visto que até este momento o seu produto não era necessário à sobrevivência da célula.

Do ponto de vista energético, a síntese de compostos orgânicos requer processos altamente dispendiosos para a célula. Regular os tipos e quantidades de compostos a serem sintetizados é muito importante para a optimização do crescimento de uma população de microrganismos. A adaptação fisiológica envolve a síntese de enzimas específicas requeridas para a adaptação a uma determinada condição ambiental. A síntese destas enzimas é uma resposta à nova condição e envolve a expressão de genes específicos, o que por sua vez, requer a existência de mecanismos de regulação génica (Madigan *et al*, 2000).

A regulação génica pode afectar qualquer passo da expressão de um gene, incluindo o início ou o fim da transcrição, a tradução, ou a actividade dos produtos finais. A regulação envolve um grupo de genes de um processo metabólico particular, tais como, o aproveitamento de um determinado açúcar como fonte de carbono ou a síntese de um determinado aminoácido (Cooper, 2000; Albert *et al*, 1998).

Principais mecanismos da regulação (figura III-5):

- Mecanismos que controlam a actividade de uma enzima pré-existente
- Mecanismos que controlam a quantidade (ou mesmo a presença ou ausência) de determinada enzima.

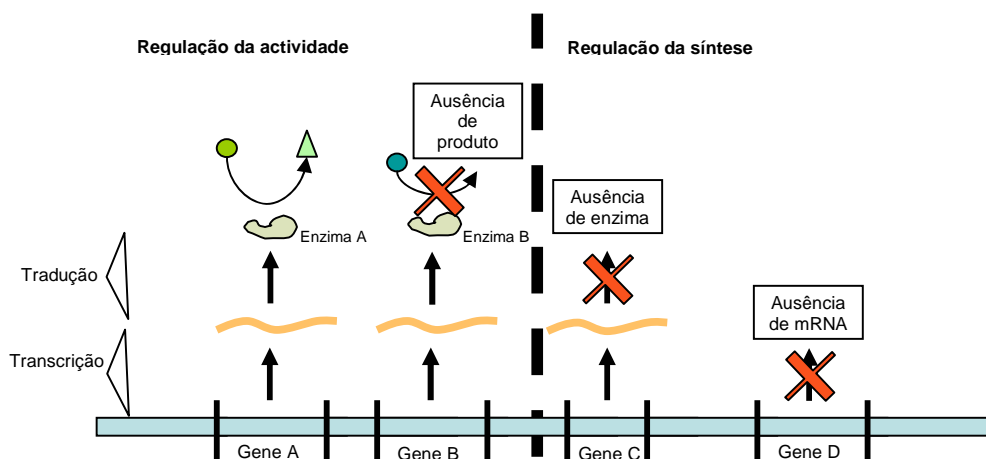


Figura III-5: Representação esquemática dos mecanismos que podem ocorrer num processo de regulação génica (adaptado de Madigan *et al*, 2000).

A regulação da actividade enzimática ocorre após a proteína em questão ser sintetizada – fase pós-traducional. A regulação da síntese enzimática pode ocorrer a nível da transcrição (regulando a quantidade de ARNm sintetizado) ou a nível da tradução (permitindo ou não a tradução de determinado ARNm em proteína). Existe uma grande variedade de mecanismos de regulação.

Regulação da actividade enzimática

Algumas proteínas só exibem actividade enzimática após sofrerem processamento. No entanto, é mais comum que as proteínas sejam sintetizadas na sua forma activa, esta actividade é subsequentemente reduzida ou inibida pela acção de compostos celulares específicos.

Um dos principais mecanismos de controlo da actividade enzimática envolve o fenómeno de inibição por “feedback”. O conhecimento deste fenómeno é extremamente importante para a produção industrial de determinado metabolito celular, como será referido mais adiante. A inibição por “feedback” ocorre principalmente na regulação de vias biossintéticas completas, tais como, as envolvidas na síntese de aminoácidos ou purinas. Estas vias apresentam, normalmente, uma série de reacções enzimáticas em que o produto final é originado a partir do substrato inicial, após várias etapas. Assim, o produto final pode inibir a primeira etapa da via, regulando a sua própria biossíntese. Ou seja, neste tipo de inibição o produto final da via biossintética inibe a actividade da primeira enzima da via. Desta forma, o aumento na concentração do produto final inibe a sua síntese. Caso o produto final seja consumido, a sua síntese pode ser restabelecida (Madigan *et al*, 2000).

A actividade da enzima pode também ser regulada por intermédio de modificações covalentes, as quais correspondem, em geral, à adição ou remoção de pequenas moléculas orgânicas. São conhecidos vários tipos destes mecanismos em microrganismos. A ligação de uma molécula orgânica promove alterações na conformação da enzima que podem afectar a sua actividade catalítica. A remoção desta, restaura a conformação activa da enzima. Existem várias moléculas orgânicas que promovem este processo, como é o exemplo, do nucleótido adenosina monofosfato (AMP) ou da adenosina difosfato (ADP) (Madigan *et al*, 2000).

Regulação da síntese enzimática

Os microrganismos exibem vários mecanismos de regulação da síntese enzimática, sendo a grande maioria influenciados pelo ambiente onde as células crescem, especialmente em relação à presença ou à ausência de pequenas moléculas específicas. Estas moléculas podem interagir com proteínas específicas, como as de ligação ao ADN, controlando a transcrição ou, mais raramente, a tradução (Madigan *et al*, 2000).

Por questões de economia no metabolismo celular encontram-se, no genoma, sequências de genes estruturais adjacentes a locais de controlo que regulam a sua transcrição (o promotor e o operador) formando o operão, no qual ocorrem os mecanismos de repressão e indução da expressão genética.

As enzimas que catalizam a síntese de um produto específico não são sintetizadas se esse produto estiver presente no meio. A repressão enzimática é um processo muito observado em microrganismos, ocorrendo como mecanismo de controlo da síntese de uma grande variedade de enzimas envolvidas na biossíntese de aminoácidos, purinas e pirimidinas. Frequentemente, o produto final de determinada via biossintética reprime as enzimas dessa mesma via, nestes casos, a repressão é bastante específica (Robertis e Robertis, 1996).

A importância da repressão enzimática para um organismo é bastante clara, visto que corresponde a um mecanismo que evita, de maneira eficiente, o gasto de energia na síntese de enzimas que não serão necessárias naquele momento.

A repressão ou indução de enzimas ocorre ao nível da transcrição, a síntese enzimática é controlada nas etapas de iniciação ou terminação da síntese de ARNm para uma ou várias enzimas. A indução da expressão genética (de um ou mais genes) resulta na síntese de enzimas cujos substratos passaram a estar presentes na célula. Por outro lado a repressão génica impede que uma ou mais enzimas continuem a ser produzidas porque os produtos da actividade enzimática atingiram uma concentração ideal ou limite para a célula. Nestes dois processos de regulação existem diversos mecanismos reguladores que irão determinar se o produto será ou não sintetizado (Robertis e Robertis, 1996).

Num processo de repressão enzimática quando um repressor se liga ao operador, presente na região reguladora de um gene, a transcrição é bloqueada, pois a ARN polimerase é impedida de se ligar ou de se mover ao longo do ADN. Assim, a proteína ou proteínas codificadas por essa molécula de ARNm serão reprimidas.

A indução enzimática também pode ser controlada por um repressor. Nesse caso, a situação previamente descrita ocorre de modo inverso. A proteína repressora encontra-se activa na ausência do indutor, bloqueando a síntese de ARNm. Quando o indutor é adicionado, este associa-se à proteína repressora, tornando-a inactiva.

Visto que os repressores têm um papel inibitório, a regulação que envolve repressores é denominada controlo negativo (figura III-6).

Outro mecanismo de controlo enzimático ocorre quando uma proteína reguladora ou activadora promove a ligação da ARN polimerase, aumentando a síntese de ARNm, designa-se este mecanismo por controlo positivo. Quando a proteína reguladora se liga ao ADN, auxilia o ARN no reconhecimento e iniciação da transcrição. A proteína reguladora pode também interagir directamente com a ARN polimerase (figura III-7).

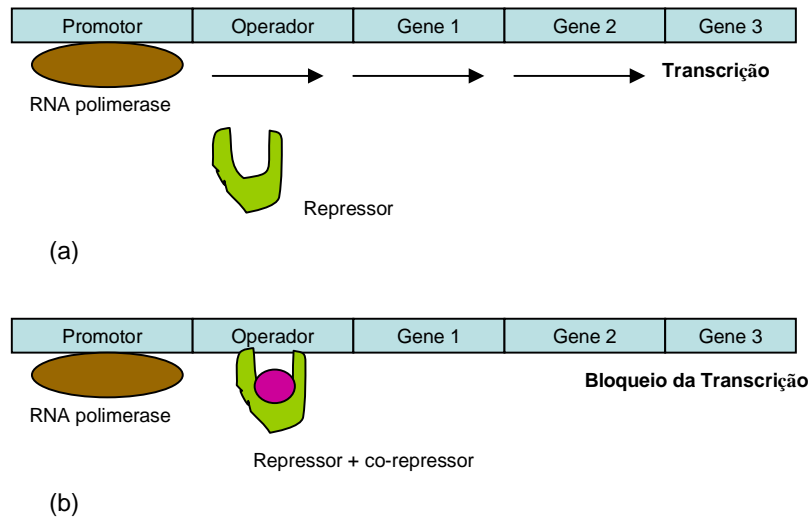


Figura III - 6: Processo de repressão enzimática. Em (a) a transcrição do operão ocorre porque o repressor não foi capaz de se ligar ao operador, em (b) após a ligação de um co-repressor ao repressor, o último é capaz de se ligar ao operador e bloquear a transcrição (*adaptado de Madigan et al, 2000*).

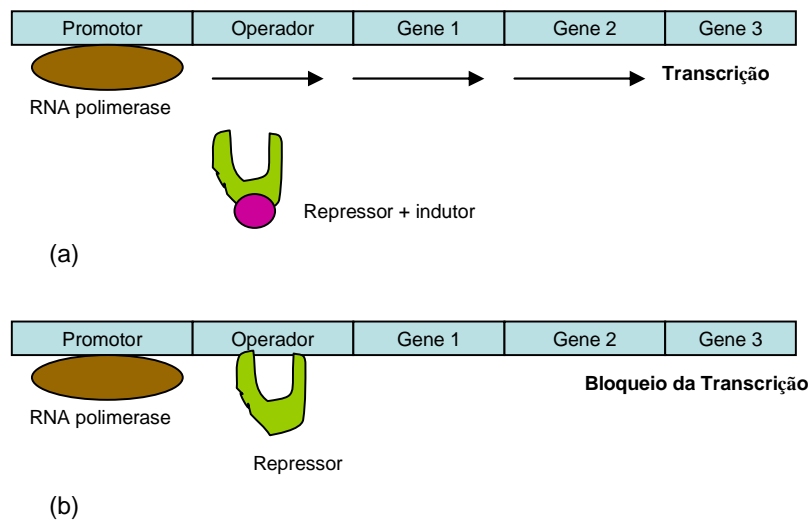


Figura III - 7: Processo de indução enzimática. Em (a) Uma molécula indutora liga-se ao repressor tornando-o inativo e impedindo a sua ligação ao operador, a transcrição pode ocorrer na normalidade, em (b) uma proteína repressora liga-se ao operador, bloqueando a ARN polimerase (*adaptado de Madigan et al, 2000*).

Os organismos necessitam frequentemente de regular vários genes diferentes simultaneamente, em resposta a alterações ambientais. Os mecanismos que respondem aos sinais ambientais regulando a expressão

de muitos genes são denominados sistemas de controlo global (Madigan *et al*, 2000). Um desses sistemas é a repressão catabólica.

Na repressão catabólica a síntese de várias enzimas não relacionadas é inibida quando as células se encontram num meio contendo uma fonte de carbono mais facilmente assimilável, tal como, é o caso da glucose. A repressão catabólica garante que o organismo utilizará inicialmente as fontes mais facilmente catabolizáveis de carbono e energia, quando estas fontes são consumidas a repressão catabólica deixa de exercer o seu papel. Este processo envolve o controlo da transcrição por meio de uma proteína activadora, a proteína activadora do catabolismo (PCA), sendo por isso um tipo de controlo positivo. Embora o processo de repressão catabólica possa ser interpretado como um simples sistema de regulação positiva, cada operação controlado pela PCA encontram-se também sob o controlo de uma proteína reguladora específica. Sendo assim, a repressão catabólica é o molde de vários sistemas de regulação não relacionados, havendo desta forma um controlo global.

Existem outros sistemas de controlo que não envolvem proteínas activadoras, o processo de atenuação é um exemplo disso. Na atenuação o controle é exercido após a iniciação da síntese de ARN e antes de terminar a transcrição. Um exemplo de atenuação é o caso do controlo da biossíntese de alguns aminoácidos em bactérias Gram negativas, como é o caso do operão triptofano de *Escherichia coli*.

Existem outros mecanismos de regulação do material genético, sendo que os mais frequentes e conhecidos já foram aqui descritos, ficando evidente que numa célula pode existir um grande leque de mecanismos de regulação e que nada acontece por acaso.

3.3. Alterações do material genético: Mutações

O fenótipo dos seres vivos resulta de interações entre factores ambientais e o genoma. A variabilidade genética é, no entanto, essencial para a evolução e sobrevivência das espécies (Ferreira e Sousa, 1998).

Uma mutação é uma alteração na sequência de ADN que se reflecte na sequência do ARN ou proteína correspondente (Robertis e Robertis, 1996). Os microrganismos procariotas são excelentes modelos para estudar os mecanismos moleculares subjacentes ao aparecimento de mutações, visto que são organismos haplóides, isto é, possuem uma única cópia de cada um dos genes do seu genoma. Assim uma alteração na sequência de bases de um determinado gene pode conduzir directamente a uma alteração fenotípica da espécie. Existem mutações que não modificam as propriedades de uma estirpe microbiana, contudo para a detecção de mutantes, é necessário que as alterações no material genético determinem mudanças no fenótipo.

Os microrganismos procariotas possuem um conjunto de mecanismos que geram alterações genéticas, estes mecanismos fornecem aos microrganismos a possibilidade de ultrapassar situações que põem em risco a sua sobrevivência, como por exemplo, a agressão por um antibiótico. Os principais mecanismos que geram

variabilidade nos microrganismos procariotas são: as mutações, os rearranjos de ADN, a recombinação entre ADNs, a aquisição de novos genes veiculada por plasmídeos e a transposição genética (Ferreira e Sousa, 1998).

3.3.1) Tipos de mutações

Existem dois tipos gerais de mutações:

- Mutações génicas: que afectam o gene; quando envolvem um único nucleótido são denominadas mutações pontuais.
- Aberrações cromossómicas: que afectam cromossomas inteiros, ou segmentos de ADN mais longos.

As mutações que reduzem ou eliminam o funcionamento genético – mutações de perda de função – são as mais abundantes. As mutações que aumentam ou alteram o tipo de actividade do gene ou a forma como este se expressa – mutações de ganho de função – são raras (Griffiths *et al*, 2000).

A análise de mutações pontuais é útil na explicação da forma como funciona o código genético. A primeira prova directa de que os genes codificam proteínas foi fornecida por Vernon Ingram, em 1957, ao mostrar que a mutação que causa a doença humana, anemia falciforme, produz a incorporação de uma valina, em vez de um ácido glutâmico na hemoglobina (o codão muda de GAA para GUA) (Robertis e Robertis, 1996).

As mutações pontuais podem ser o resultado de substituições de pares de bases do ADN ou por inserção ou eliminação de um par de bases. E podem resultar em mutações “missense” (de significado diferente), “nonsense” (sem significado) ou “samesense” (com significado idêntico) (Robertis e Robertis, 1996).

As mutações podem ser espontâneas ou induzidas. Mutações espontâneas podem ser resultado da acção da radiação natural que promove alterações nas bases de ADN ou ocorrer durante a replicação como resultado de erros durante o emparelhamento das bases, levando a alterações na molécula replicada de ADN (Griffiths *et al*, 2000).

3.3.2) Taxas de mutação

As taxas de ocorrência dos diferentes tipos de mutações variam bastante. Enquanto alguns tipos são muito raros, outros são extremamente frequentes.

A frequência de erros durante a replicação do ADN varia de 10^{-7} a 10^{-11} por pares de bases durante um único ciclo de replicação. Assim, numa cultura normal de organismos em crescimento activo, com cerca de 10^8 células/ml provavelmente poderão ser encontrados vários mutantes. As transposições são mais frequentes, com taxas aproximadamente de 10^{-4} . As mutações “nonsense” são menos frequentes, variando de 10^{-6} e 10^{-8} (Madigan *et al*, 2000).

Como veremos seguidamente, é possível aumentar significativamente a taxa de mutação utilizando agentes mutagénicos, tais como, agentes químicos, físicos.

3.3.3) Agentes mutagénicos

A exposição a agentes mutagénicos aumenta a frequência de mutação. Os agentes mutagénicos criam lesões no ADN em todos os tipos de células, quer sejam procariotas ou eucariotas.

O processo de mutação induzido pela utilização de um agente mutagénico implica duas etapas: a indução de mutações, na cultura de microrganismos, com o mutagénico escolhido e o isolamento dos mutantes para posterior ensaio e selecção.

A escolha de um agente mutagénico depende, de forma geral, de aspectos práticos. Poder-se-á utilizar só um agente de forma maciça ou utilizar um conjunto de agentes. A técnica a usar pode produzir uma elevada taxa de mutações ou pode favorecer a separação de um número reduzido de tipos desejáveis de um grande número de produtores não desejáveis. O conhecimento das vias e mecanismos de controlo da biossíntese de um produto facilita a estratégia a seguir durante todo o processo.

A indução de mutações em microrganismos pode ter diversos objectivos, tais como, o melhoramento da produção por parte das estirpes microbianas industriais, com posterior selecção dos melhores clones e a obtenção de estirpes produtoras de novos metabolitos (Leveau e Bouix, 2000).

Os agentes mutagénicos podem ser agrupados em dois grupos (Leveau e Bouix, 2000; Madigan *et al*, 2000):

- **Agentes mutagénicos químicos:** estes dividem-se em várias classes, como por exemplo, os análogos de bases, que possuem estrutura semelhante às bases do ADN (purinas e pirimidinas), promovendo o emparelhamento incorrecto das bases. Outros agentes podem actuar directamente no ADN, resultando em emparelhamentos incorrectos ou outras modificações, sendo exemplos disso os agentes alquilantes, os quais exibem actividades distintas aos anteriores uma vez que, ao reagir com o ADN, podem introduzir directamente alterações em moléculas de ADN que não se encontram na fase de replicação (Madigan *et al*, 2000).

A indução de mutação é feita adicionando o agente mutagénico a uma suspensão de células, a qual é incubada a temperatura constante durante um determinado tempo. Entre estes agentes destacam-se: o ácido nítrico que induz transições A-T→G-C e/ou eliminações por ligações cruzadas no interior da cadeia, a N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) que é um agente mutagénico com baixa percentagem de mortalidade; e os agentes mutagénicos estruturais, como a proflavina ou laranja de acridina que não são

incorporados covalentemente no ADN, intercalando-se somente na molécula, promovendo adições ou deleções simples durante a síntese.

- **Agentes mutagénicos físicos**, neste grupo podemos incluir as radiações, as quais, se dividem em radiações não ionizantes (electromagnéticas) de utilização mais ampla e as radiações ionizantes (Leveau e Bouix, 2000; Madigan *et al*, 2000; Waites *et al*, 2001).

- **Radiação ultravioleta**

A radiação ultravioleta (UV) é fortemente absorvida pelas bases purimidinas, sendo o máximo de absorção para o ADN a 260 nm (Griffiths *et al*, 2000; Madigan *et al*, 2000).

A fonte de radiação UV mais frequentemente usada para a mutagénese é obtida com uma lâmpada germicida, que emite grandes quantidades de radiação UV na faixa de 260nm. São utilizadas doses de radiação UV que promovem de 90 a 95% de mortes na população celular, sendo que os mutantes são seleccionados de entre os sobreviventes. A radiação UV é uma ferramenta muito útil no isolamento de mutantes em culturas microbianas (Madigan *et al*, 2000; Waites *et al*, 2001).

A radiação UV gera vários fotoprodutos no ADN, tais como o fotodímero ou dímero de pirimidina, no qual as pirimidinas adjacentes (citosina ou timina) ficam covalentemente ligadas por um anel ciclobutano. As pirimidinas destes dímeros não são capazes de emparelhar com as purinas complementares, desta forma, há um aumento da probabilidade da ADN polimerase inserir um nucleótido incorrecto durante a replicação ou da paragem da replicação. Outro fotoproducto é o designado fotoproducto 6-4 com a forma 5'-C-C-3' e 5'-T-C-3', entre as posições C-6 e C-4 de duas pirimidinas adjacentes (figura III-8).

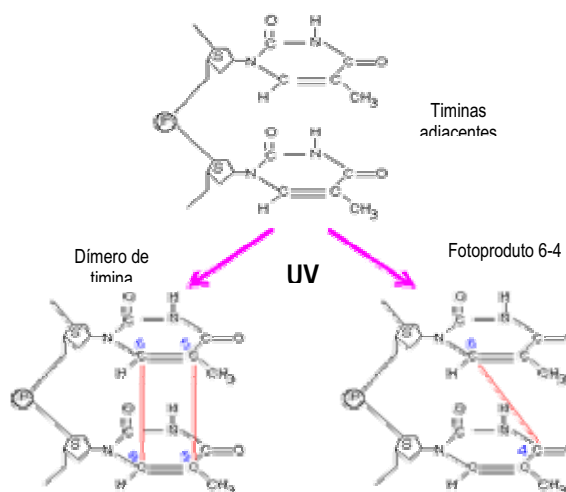


Figura III - 8: Formação de um dímero de pirimidina induzido por luz ultravioleta. Nesta figura é usada uma timina como exemplo embora a citosina também forme dímeros semelhantes (*in* <http://www.web-books.com/mobio/free/ch7f5.htm>).

A energia necessária para provocar dano ou morte do microrganismo depende da intensidade e tempo de exposição da luz UV e das características físicas e metabólicas do microrganismo alvo (por exemplo, a capacidade do microrganismo formar estruturas resistentes).

Outro factor a ter em conta quando se utiliza a luz UV é a distância da fonte de luz à cultura a irradiar; os raios UVs são predominantemente emitidos perpendicularmente à superfície da lâmpada, sendo que a intensidade diminui quanto maior a distância entre a lâmpada e a cultura a irradiar (Beggs, 2002).

3.4. Mecanismos de reparação genética

Todos os seres vivos possuem poderosos sistemas de reparação (figura III-9) das lesões que o ADN sofre. Não existe uma relação absoluta entre os mecanismos de reparação e a natureza da lesão a ser reparada, havendo vários sistemas que podem actuar individualmente ou competitivamente (Videira, 2001).

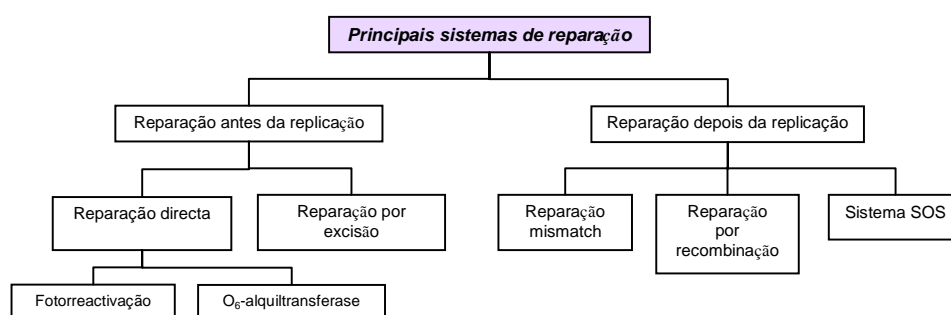


Figura III - 9: Principais sistemas de reparação do ADN (Videira, 2001)

A fotorreactivação (figura III-10) é o principal sistema de reparação directa de lesões no ADN, ocorrendo com grande frequência em membros do género *Bacillus* (Beggs, 2002). Actua especificamente sobre dímeros de pirimidinas, pela acção da enzima fotolíase, na presença de luz visível, os dímeros são monomerizados directamente (Videira, 2001). É, desta forma, dependente da luz e é o principal mecanismo de defesa de muitos microrganismos para reparar danos causados pela radiação UV. A reparação por fotorreactivação ocorre em duas fases (Beggs, 2002):

- A enzima fotolíase combina-se com os dímeros de pirimidina formando o complexo enzima-substrato.
- O complexo formado é activado por absorção de fotões de luz entre 320-440nm, e com a acção adicional da flavina-adenina-dinucleotida (FAD), a fotolíase separa os anéis de ciclobutano regenerando os monómeros originais.

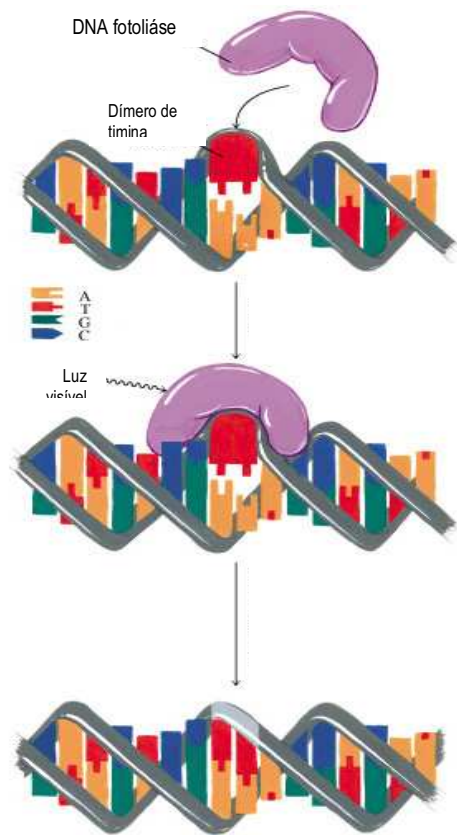


Figura III - 10: Mecanismo de fotorreactivação (*in* <http://www.web-books.com/mobio/free/ch7f5.htm>).

As alquiltransferases, outro sistema de reparação directa, transferem grupos alquilo ligados ao O₆ da guanina para o resíduo de cisteína, o que leva à sua inactivação.

Na reparação por excisão, actuam enzimas (por exemplo glicosilases, endonucleases, exonucleases) que retiram as bases alteradas ou cortam as ligações fosfodiésteres da zona danificada, seguindo-se a síntese com reparação; a enzima ligase sela as quebras reparando o ADN (Griffiths *et al*, 2001; Videira, 2001). Este mecanismo não é dependente da luz.

A reparação do tipo “mismatch repair” é um mecanismo que actua depois da replicação, baseia-se em diferenças existentes entre a cadeia mãe e a nova cadeia, actuando inicialmente para reconhecer os pares de bases mal emparelhados, determinando qual a base incorrecta, na fase de reparação ocorre a excisão da base incorrecta e reparação por síntese (Griffiths *et al*, 2001).

Na reparação por recombinação, a lesão é removida e o espaço resultante é preenchido por ADN cortado da molécula irmã, este processo não está sujeito a erros.

Na resposta SOS, conhecida apenas em procariotas, um complexo sistema enzimático actua permitindo que a polimerase III continue a síntese face a lesões graves. Não havendo possibilidade de emparelhamentos nesta região, são introduzidas bases ao acaso, estando este tipo de reparação altamente sujeita a erros (Videira, 2001 e Taguchi, 2004).

3.5. Biotecnologia na terapêutica de doenças: Produção de antibióticos

O desenvolvimento de antibióticos como agentes de tratamento de doenças foi, provavelmente, uma das descobertas com maior impacto nas práticas da medicina. Os antibióticos constituem uma das mais importantes substâncias produzidas por microrganismos em processos biotecnológicos (Madigan *et al*, 2000).

A era da produção de antibióticos teve a sua origem na descoberta da penicilina por Fleming, em 1929. Em 1940, *Florey e Chain* utilizaram a penicilina no tratamento de doenças infecciosas em seres humanos. No entanto, foi durante a Segunda Guerra Mundial que devido à necessidade urgente da utilização de antibióticos, se desenvolveu o processo de produção em grande escala destes compostos.

A utilização dos antibióticos no tratamento de doenças infecciosas constituiu uma das grandes conquistas da medicina no século XX. Foi graças à sua descoberta que as doenças infecciosas deixaram de ser a principal causa de morte.

Os antibióticos são principalmente conhecidos pelas suas aplicações médicas, contudo, apresentam também um interesse significativo nos campos da saúde e criação animal e da agricultura (Berdy, 1980 *in* Leveau e Bouix, 2000).

3.5.1. Características e definição de antibiótico

Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular, produzidos por microrganismos, capazes de matar ou inibir o crescimento de outros microrganismos. Esta inibição pode ser permanente (acção bactericida) ou temporária (acção bacteriostática). Podem ser químicos sintetizados em laboratório, naturais ou semi-sintéticos (antibióticos naturais que podem sofrer transformações químicas em laboratório para melhoramento das suas propriedades) (Madigan *et al*, 2000; Sawan e Marivannan, 2000; Waites *et al*, 2001).

Os antibióticos evidenciam ter funções na sobrevivência dos microrganismos que os sintetizam na Natureza. No entanto, dada a sua variedade química e os seus diferentes mecanismos de acção, estas não são claras. Os antibióticos apresentam toxicidade selectiva, ou seja, afectam o microrganismo alvo sem afectar o hospedeiro (Waites *et al*, 2001).

Os microrganismos podem actuar ao nível da competição com outros microrganismos, como reguladores de processos metabólicos, e ainda como factores de regulação ou acompanhamento de processos de diferenciação e morfogénese (Demain, 1974; Vanek e Mikulik, 1978; Zahner, 1979 *in* Mendo 1997).

Quanto ao seu mecanismo de acção os antibióticos podem (Madigan *et al*, 2000; Waites *et al*, 2001):

- Alterar a permeabilidade da membrana celular do microrganismo alvo (ex.: as Polimixinas e as Gramicidina);
- Inibir a síntese da parede celular do microrganismo (ex.: antibióticos β -lactâmicos, Bacitracina, Fosfomicina);
- Inibir a síntese proteica, (ex.: *Aminoglicosídeos*, *Streptomicina*, *Tetraciclina*, *Cloranfenicol*, *Macrólidos*, *Ácido fusídico*);
- Inibir a síntese dos ácidos nucleicos (ex. *Quinolonas*, *Metronidazol*);
- Inibir metabolitos essenciais (ex: ácido fólico, que é essencial para síntese de ARN e ADN)

3.5.2. Classificação dos antibióticos

Os antibióticos podem ser classificados em função de diferentes critérios: origem, mecanismo de acção, organismos produtores, estrutura química, espectro de acção (Madigan *et al*, 2000; Waites *et al*, 2001).

1- De acordo com a sua origem, podem ser:

- Naturais
- Sintéticos
- Semisintéticos

2- De acordo com a sua estrutura química:

- β -lactâmicos (ex. penicilina, cefalosporina)
- macrólidos (ex. eritromicina)
- aminoglicósidos (ex. estreptomicina)
- polipeptídicos (ex. bacitracina)
- poliénicos (ex. anfotericina B)
- tetraciclina (ex. oxitetraciclina, doxiciclina)
- antraciclina (ex. daunorrubina)

3- Quanto ao seu mecanismo de acção:

- Inibem a síntese da parede celular
- Actuam sobre a membrana celular alterando a sua permeabilidade
- Inibem a síntese proteica

- Inibem a síntese de ácidos nucleicos
- Inibem metabolitos essenciais

3.5.3. Microrganismos produtores de antibióticos

Num determinado ambiente, o facto de muitas espécies dominarem em relação a outras deve-se à produção de substâncias que se propagam no solo e eliminam ou impedem o crescimento de outras espécies. Trata-se de um fenómeno de antibiose e as substâncias referidas são os antibióticos.

A produção de antibióticos por microrganismos é um processo comum, sendo na sua maioria verificada em microrganismos do solo. A maior parte dos microrganismos que produzem antibióticos com valor medicinal inserem-se em três grupos (Madigan *et al*, 2000):

- Fungos, especialmente do género *Penicillium*, produtores de penicilina e de griseofulvina;
- Bactérias do género *Bacillus*, produtoras de bacitracina e de polimixina;
- Bactérias do género *Streptomyces*, produtoras de cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina e de tetraciclina.

Destes três grupos de microrganismos, *Streptomyces*, um Actinomicete, é o que produz maior número de antibióticos com interesse médico (Tabela III-7 e Tabela III-8).

Tabela III - 7: Importância relativa dos grupos microbianos produtores de antibióticos (Adaptado de Bushell, 1982 *in* Leveau e Bouix, 2000):

Microrganismos produtores de antibióticos	% Total de antibióticos
Fungos	
<i>Penicillium</i>	4,1
<i>Aspergillus</i>	3,0
<i>Fusarium</i>	4,1
<i>Cephalosporium</i>	1,2
Outros fungos imperfeitos	0,8
Basidiomicetos e ascomicetos	5,4
Bactérias	
<i>Pseudomonadaceae</i>	1,3
<i>Bacillaceae</i>	7,0
Outras eubactérias	1,7
Actinomicetes	69,7

Tabela III - 8: Alguns antibióticos de interesse comercial e respectivos microrganismos produtores (adaptado de Madigan *et al*, 2000)

Antibiótico	Microrganismo produtor
Bacitracina	<i>Bacillus licheniformis</i>
Cefalosporina	<i>Cephalosporium sp</i>
Cicloheximida	<i>Streptomyces griseus</i>
Cicloserina	<i>Streptomyces orchidaceus</i>
Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i>
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvin</i>
Canamicina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
Lincomicina	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>
Nistatina	<i>Streptomyces noursei</i>
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Streptomicina	<i>Streptomyces griseus</i>
Tetraciclina	<i>Streptomyces rimosus</i>

Os antibióticos, produzidos por Actinomicetes, possuem estruturas químicas muito diversas e exercem actividades variadas que podem ser do tipo antibacteriano, antifúngico, anticancerígenos, antiparasitário ou antiviral (Leveau e Bouix, 2000).

3.5.4. Principal habitat dos microrganismos produtores de antibióticos

Os microrganismos produtores de antibióticos podem-se encontrar em múltiplos substratos naturais. Por exemplo, os Actinomicetes estão amplamente distribuídos nos solos com excepção dos lugares expostos a condições demasiado extremas. Podemos encontrá-los sobretudo na camada compreendida entre a superfície do solo e os 2 metros de profundidade. O seu número varia, mas é frequente em terras férteis encontrar 10^6 unidades formadoras de colónias por grama de terra seca (Leveau e Bouix, 2000).

A proporção de actinomicetes em relação aos outros microrganismos varia entre 10 e 50%. Os géneros *Streptomyces*, *Nocardia* e *Micromonospora* são os mais frequentes, o género *Streptomyces* encontra-se em maior percentagem no solo, cerca de 95% (Leveau e Bouix, 2000).

3.5.5. O metabolismo microbiano e a produção de antibióticos

O metabolismo microbiano pode dividir-se em: primário e secundário. O metabolismo primário ocorre durante a fase primária do crescimento do microrganismo, enquanto que o metabolismo secundário ocorre aquando a finalização da fase de crescimento (Madigan *et al*; 2000).

O metabolismo primário corresponde ao conjunto das vias catabólicas, anfibólicas e anabólicas que fornecem ao organismo a energia e as moléculas necessárias para o seu crescimento (Leveau e Bouix, 2000).

Um metabolito típico do metabolismo primário microbiano é o etanol. Este é o produto do metabolismo anaeróbico de leveduras e certas bactérias. Os metabolitos produzidos durante a fase estacionária são designados, como já referido, metabolitos secundários e alguns destes são muito frequentes e com interesse comercial, como é o exemplo dos antibióticos (figura III -11).

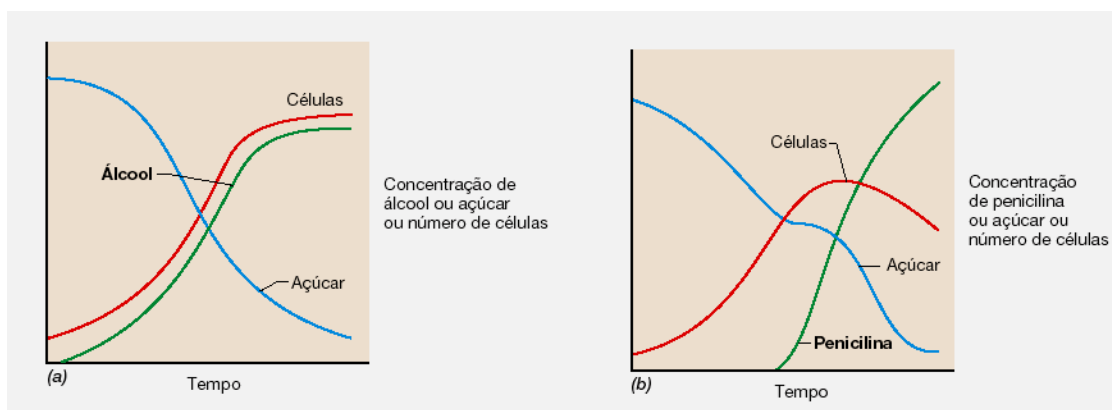


Figura III - 11: Diferença entre a produção de metabolitos primários e secundários. (a) Formação de álcool por leveduras, um exemplo de metabolito primário. (b) Produção de penicilina pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, um exemplo de metabolito secundário (Madigan *et al*, 2000).

Os metabolitos secundários definem-se como sendo compostos de baixo peso molecular, compostos estes, que não são essenciais para o crescimento do microrganismo produtor. A produção de metabolitos secundários, correspondente à fase estacionária da curva de crescimento, como já referido, designa-se idiofase na medida em que está caracterizada por uma idiosincrasia metabólica (Leveau e Bouix, 2000; Bibb, 2005).

No caso de antibióticos, a idiofase está associada à expressão de mecanismos que permitem ao microrganismo produtor sobreviver na presença do antibiótico sintetizado; entre estes mecanismos podem-se salientar os seguintes (Leveau e Bouix, 2000):

- Modificação enzimática do antibiótico;
- Alteração da permeabilidade ao antibiótico produzido;
- Modificação do alvo celular do antibiótico.

O conjunto dos metabolitos secundários conhecidos corresponde a uma grande diversidade de famílias de compostos orgânicos, sobretudo aminoaçúcares, epóxidos, alcalóides, quinonas, glucósidos, lactonas, macrólidos, nucleósidos, péptidos, fenazinas, quinolinas, tetraciclina, naftalenos, poliacetilenos, β -lactaminas (Berdy, 1985 in Leveau e Bouix, 2000; Demain, 1998).

Os metabolitos secundários possuem as seguintes características (Madigan *et al*, 2000):

- Não são essenciais para o crescimento e reprodução do microrganismo produtor;
- A sua formação é dependente das condições de crescimento.
- São muitas vezes produzidos por um grupo restrito de microrganismos. Por exemplo, várias espécies de *Streptomyces* são conhecidas como produtoras de cerca de 30 tipos diferentes do antibiótico antraciclina.

3.5.6. Regulação da produção de antibióticos

A produção de determinado antibiótico pode ser afectada por diversos factores visto que existem na célula processos de regulação dessa mesma produção.

Regulação fisiológica

- **Regulação por fontes de carbono** – A presença no meio de cultura de quantidades elevadas de fontes de carbono facilmente metabolizáveis como a glucose podem impedir a produção de antibióticos (repressão catabólica). Normalmente, isto ocorre por repressão da transcrição dos genes de enzimas biossintéticas. Em *E. coli*, por exemplo, o mediador da repressão catabólica é o AMP cíclico, mas em organismos produtores de antibiótico, como em *Streptomyces*, parece ocorrer de forma diferente (Waites *et al*, 2001).

Existem outros factores que influenciam a regulação catabólica por fontes de carbono, tais como, a diminuição de pH ou a falta de O₂ dissolvido. Embora esta interferência não pareça ser influenciada directamente pela alteração do pH, ocorre uma acumulação de formas não dissociadas do ácido acético e pirúvico, quando as culturas crescem na presença de elevadas concentrações de glucose (Martin e Demain, 1980).

- **Regulação por fontes de azoto** – A presença de quantidades elevadas de azoto em formas facilmente metabolizadas, como é o caso da amónia ou do sulfato de amónia, também impedem a produção de antibióticos. A amónia, por exemplo, reprime a actividade de enzimas envolvidas no uso de outras fontes de azoto, tais como, nitrato-redutase, nitrito-redutase, arginase, protease extracelular entre outras (Martin e Demain, 1980). Em *Streptomyces griseus* a produção de estreptomicina incrementa até três vezes quando se utiliza prolina (mais difícil de metabolizar) como única fonte de azoto. Os mecanismos pelos quais se exerce esta regulação ainda não são claros, contudo, pensa-se que ocorram a nível da transcrição.

- **Regulação por fontes de fosfato** – Quantidades elevadas de fosfato no meio, normalmente reprimem a produção de antibióticos, mas existem casos em que isso não acontece. Um exemplo disso é a produção de ácido clavulânico e cefamicinas em *Streptomyces clavuligerus*, em que a produção do primeiro é reprimida enquanto a do segundo não é afectada, isto permite dissociar a produção de ambos os compostos ajustando as concentrações de fosfato no meio (Waites *et al*, 2001).

Outro exemplo, é o caso dos aminoglicosídeos como a estreptomicina e a neomicina (*Streptomyces griseus*, *S. fradiae*) que são produzidas como moléculas fosforiladas inactivadas, sendo posteriormente activadas por fosfatases no processo de secreção. A abundância de fosfato faz com que se acumule o produto inactivo (fosforilado) por inibição ou repressão das fosfatases correspondentes. Noutros casos, as enzimas afectadas são as sintetases que não utilizam directamente grupos fosfato mas são inibidas ou reprimidas pela sua presença (Martin e Demain, 1980).

Os mecanismos do efeito do fosfato ainda não estão claros, mas pensa-se que a adenosina monofosfato cíclica (AMPc), a adenosina tri-fosfato (ATP), a guanosina trifosfato GTP e a guanosina-tetrafosfato (ppGpp) estejam envolvidas (Waites *et al*, 2001).

- **Efeito de precursores e produtos finais** – Existem mecanismos de “feedback” que controlam a produção de antibióticos: a presença do produto final (antibiótico) pode alcançar níveis que reprima a sua própria síntese, pelo que, em muitos casos de produção industrial, o antibiótico deve ser retirado continuamente do meio de cultura para evitar inibições. Em quase todos os casos, o produto final inibe algumas enzimas implicadas na sua biossíntese (Waites *et al*, 2001).

- **Factores físicos**

Temperatura – Cada organismo apresenta temperaturas óptimas de crescimento. Perante a produção em grande escala do produto de um determinado microrganismo, a temperatura, é um factor que se deve ter em conta. O metabolismo gera calor, que deve ser dissipado adequadamente para evitar que as enzimas biossintéticas desnaturem.

Arejamento – A adequada taxa de oxigénio deve ser estritamente controlada. Várias enzimas que actuam na biossíntese de β -lactâmicos em especial, e outros antibióticos, necessitam oxigénio para a sua actividade.

pH – Cada organismo produtor tem um pH óptimo para a produção. Por exemplo, os β -lactâmicos de fungos produzem-se melhor a pHs ligeiramente alcalinos (aproximadamente 8). Na regulação por pH está envolvido o regulador da transcrição, o gene *pacC*, que, a pHs alcalinos, activa a expressão dos genes biossintéticos, em vez de reprimir a expressão de genes específicos de condições ácidas (Waites *et al*, 2001).

- **Regulação por efectores pleiotrópicos** – Além dos factores mencionados existem diversas moléculas com actividade reguladora geral. Um exemplo disso é o caso do factor A (uma γ -butirolactona que pertence a uma família de autoreguladores bacterianos), produzido em resposta a factores ainda desconhecidos (pensa-se que seja a densidade celular ou quorum), activa indirectamente a produção de estreptomicina em *S. griseus* ao inactivar um repressor da diferenciação morfológica (esporulação) e os genes de resistência da streptomicina, numa cadeia de transmissão de sinais.

Uma outra molécula sinalizadora intracelular é o ppGpp, derivado do GTP, e pode ser considerado um sinal, produzido em resposta a uma diminuição da concentração de aminoácidos que desencadeia uma paragem na síntese de ARNs mensageiros (“stringent response”). O ppGpp é um sensor da taxa de crescimento que favorece a produção de antibióticos (Waites *et al*, 2001).

Regulação genética

Existe uma multiplicidade de mecanismos de regulação a nível genético, nas várias fases da síntese enzimática que, poderão afectar directa ou indirectamente esta mesma produção, tal como já foi referido no subcapítulo da regulação génica de microrganismos.

Em geral, a produção de antibióticos encontra-se integrada num complexo sistema regulador, no qual existem imensos níveis de controlo e interacção fisiológica e genética.

3.5.7. Descoberta de novos antibióticos

Conhecem-se actualmente mais de 8000 antibióticos todos eles produzidos, principalmente por microrganismos do género *Streptomyces*, *Penicillium* e *Bacillus* (Madigan *et al*, 2000).

A forma mais comum para pesquisa de novos antibióticos é a procura, também designada por “screening”. Neste método um largo número de microrganismos, possíveis produtores de antibióticos, são obtidos a partir da natureza e isolados, extraindo o antibiótico a partir de culturas puras (Madigan *et al*, 2000). A determinação da acção de determinado antibiótico é feita utilizando um ensaio simples, no qual se determina a susceptibilidade de um microrganismo sensível quando na presença do antibiótico.

O estudo da susceptibilidade do microrganismo sensível é efectuado pela utilização de discos embebidos em antibiótico. Estes são colocados na superfície de caixas de agar após inoculação com o agente a testar, e antes da incubação. Cada disco contém um volume e uma concentração conhecida do antibiótico em estudo. Durante a incubação o antibiótico difunde-se pelo meio de cultura criando um gradiente de concentração (com concentrações mais elevadas na margem do disco). As células inoculadas à superfície do agar crescem confluentemente formando um tapete celular, excepto quando o crescimento do microrganismo é inibido pelo

antibiótico. Se isso acontecer, observa-se à volta do disco uma zona clara em que não ocorreu crescimento bacteriano. Esta zona é designada por zona de inibição.

A eficácia de um antibiótico é determinada com base no diâmetro da zona de inibição, podendo esta variar de acordo com a velocidade de difusão do antibiótico no agar, com a concentração do meio de cultura, com a altura do meio, etc. Devido a este facto, tornou-se necessário padronizar a técnica de forma a ser possível relacionar o tamanho da zona de inibição com o comportamento do isolado microbiano (resistente, sensível ou intermédio) na presença de um determinado antibiótico. O método padronizado de Kirby-Bauer evita variações nos resultados devido a alterações no procedimento. Este tem em conta uma série de factores, tais como, a densidade do inóculo, principalmente em sistemas de microdiluição; o método de preparação do inóculo, a composição, pH e espessura do meio de cultura, as condições de incubação, etc. Por exemplo, só é utilizado meio agarizado de pH 7,2 a 7, 4. O meio é distribuído em caixas de Petri em camadas com altura de 4mm (25 ml em caixas de 100mm de diâmetro) (Madigan *et al*, 2000).

3.5.8. Aplicações dos antibióticos

Os antibióticos na saúde humana – a actividade biológica dos antibióticos, pela sua diversidade, estrutura e mecanismos de acção, pode actuar sobre bactérias, fungos, parasitas, vírus assim como tumores.

Como exemplo, temos a cefamicinas, as gentamicinas produzidas por *Micromonospora sp.* utilizada para tratar infecções causadas por bactérias Gram negativas; a rifampicina, um derivado da hemissíntese da rifamicina produzido por *Nocardia mediterranei*, utilizada para o tratamento da tuberculose; a 9-β-D-arabinofuranosiladenina produzida por *S. antibioticus*, é sintetizada por via química e activa sobre o vírus da herpes (Leveau e Bouix, 2000).

Os antibióticos na saúde e criação animal – existem antibióticos que são adicionados a baixas concentrações (10 a 80 ppm) ao alimento dos animais com a finalidade de estimular o crescimento e melhoramento do rendimento alimentar – zootécnica, e a protecção das crias jovens – profiláctica. Os antibióticos são também amplamente utilizados na medicina veterinária.

Entre os antibióticos utilizados na alimentação animal podemos referir a tilosina, antibiótico da família dos macrólidos.

Os antibióticos na agricultura – existem antibióticos usados no campo fitossanitário, no qual é aplicada a estreptomicina, a tetraciclina, a cicloheximida e a griseofulvina.

Por outro lado, foram desenvolvidos antibióticos destinados unicamente à agricultura. Actividade que se estende a diferentes campos: controlo de pragas nos vegetais, insecticidas, herbicidas e reguladores do metabolismo vegetal. Estes produtos têm a vantagem de serem activos a baixas concentrações (10 a 50 ppm) e

rapidamente biodegradáveis. No entanto, é possível o aparecimento de microrganismos fitopatogénicos resistentes (Leveau e Bouix, 2000).

3.6. Microrganismos e a indústria: actividade enzimática

3.6.1. Origem e função das enzimas

Como acontece com todas as proteínas, as enzimas são produzidas no interior das células pelos ribossomas, nos quais é feita a ligação entre os aminoácidos, formando-se as cadeias polipeptídicas. A maioria das enzimas industriais é produzida por microrganismos.

A estrutura e propriedade das enzimas produzidas por uma célula particular é determinada pela informação presente no ADN dessa mesma célula. Cada gene determina a estrutura particular da proteína, os 20 aminoácidos são especificados por um conjunto particular de três bases. A informação contida na dupla cadeia de ADN é transferida para uma cadeia simples de ácidos ribonucleicos (ARN), por um processo denominado, transcrição. Seguidamente, a informação transcrita é convertida, de acordo com o código genético numa sequência de aminoácidos, processo denominado por tradução ou síntese proteica (Videira, 2001). O resultado deste processo celular é a formação e crescimento da molécula proteica a partir do ARN mensageiro (figura III-12).

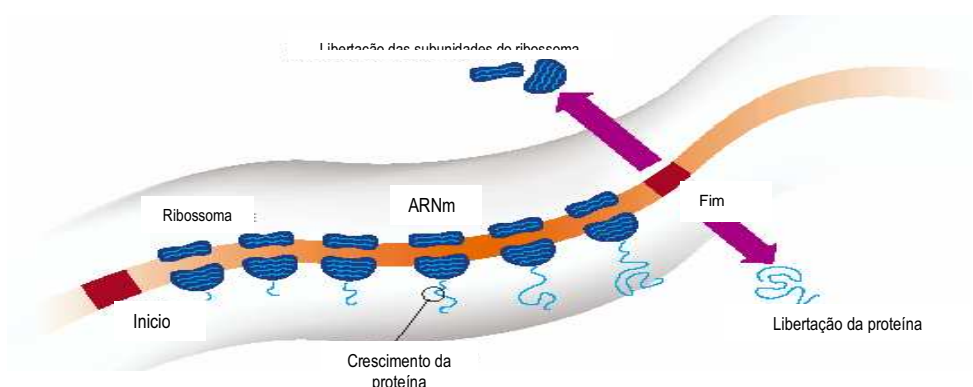


Figura III - 12: Processo de síntese proteica

Durante e depois da formação da cadeia primária dos resíduos de aminoácido (polipeptídeos de estrutura primária) estes são submetidos a um processo de conformação espacial controlada (estrutura secundária) até que se forme uma proteína tridimensional (estrutura terciária). É a conformação espacial final da enzima que determina a sua especificidade e actividade. Algumas enzimas somente são activas na presença de cofactores, os quais, podem ser inorgânicos como metais iónicos (por exemplo Zn^{2+} , Ca^{2+}) ou coenzimas, que têm origem nas vitaminas como a tiamina e riboflavina. As enzimas actuam sobre grupos funcionais, os substratos. São

entre todos os tipos de catalizadores os mais eficientes podendo algumas delas aumentar a velocidade de reacção por um factor 10^{20} (Campos, 2002).

As enzimas são mais eficientes que os catalizadores químicos, pois conseguem baixar mais a sua energia de activação. A sua natureza proteica confere-lhe uma especificidade muito elevada, no entanto a sua actividade pode ser sujeita a controlo o que é da maior importância na regulação do metabolismo celular (Campos, 2002; Lima e Mota, 2003). Enquanto que as reacções catalisadas por enzimas ocorrem em condições de temperaturas abaixo dos 100°C , pressão atmosférica, e pH próximos da neutralidade; a catálise química requer, frequentemente temperaturas e pressões elevadas, bem como valores de pH extremos.

Como já referido as enzimas têm uma especificidade de reacção muito maior quanto aos substratos e produtos que os catalisadores químicos. Por exemplo, na síntese enzimática de proteínas nos ribossomas, sintetizam-se polipéptidos de mais de 1000 aminoácidos sem erros. Pelo contrário, na síntese química de polipéptidos ocorrem reacções secundárias e incompletas, o que limita o comprimento das cadeias polipeptídicas, ocorrendo bastantes erros que baixam o rendimento (Olsen, 2004).

As actividades catalíticas de muitas enzimas variam em resposta às concentrações dos substratos. Os mecanismos do processo de regulação incluem o controlo alostérico, a modificação covalente das enzimas e a variação nas quantidades de enzima sintetizada (Campos, 2002).

Uma simples reacção enzimática pode ser definida pela fórmula seguinte: $E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$, onde E , S e P representam a enzima, o substrato e o produto, respectivamente e ES representa o complexo reversível enzima-substrato (Campos, 2002; Olsen, 2004).

Em cada momento de uma reacção enzimática, a velocidade é dada por: $V = \frac{\text{Produto formado}}{\text{tempo}}$, ou

seja, $v = \frac{\Delta P}{\Delta t} = -\frac{\Delta S}{\Delta t}$. Como se pode verificar na figura III-13, a velocidade é mais elevada no início e vai

decrecendo ao longo do tempo. Isto acontece porque, com o aumento de P inicia-se a reacção inversa, $P \rightarrow S$; a concentração de S vai decrescendo ao longo do tempo de reacção, o que consequentemente diminui a velocidade directa $S \rightarrow P$. Se a reacção for muito prolongada, começa a haver diminuição da actividade enzimática.

A reacção da variação da velocidade (número de moléculas convertidas por unidade de tempo) é directamente proporcional à concentração de enzima variando com a concentração de substrato.

A concentração do substrato de uma reacção enzimática, $[S]$, afecta a velocidade de reacção. Para concentrações mais baixas de substrato, cada vez que este duplica, duplica o valor da velocidade inicial, com o aumento da concentração de substrato, a velocidade começa a variar cada vez menos, tendendo para um valor

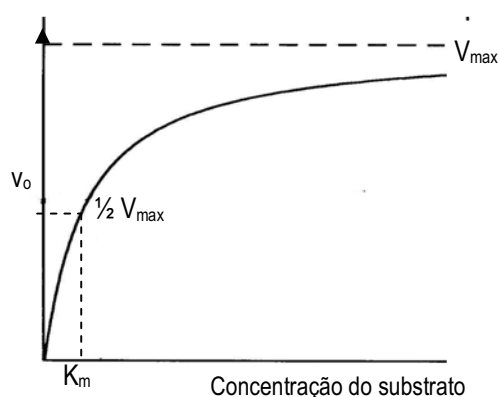


Figura III - 13: Efeito da concentração de substrato na velocidade de reacção enzimática - curva de Michaelis-Menten, que representa o comportamento enzimático mais comum (Campos, 2002).

constante de Michaelis. K_M é o valor de $[S]$ para o qual $v_0 = V_{\max}/2$ e é uma medida da afinidade do enzima por um determinado substrato. Ou seja, uma enzima que tenha um baixo valor de K_M para um substrato, atinge a sua eficiência catalítica máxima a uma baixa concentração de substrato (Campos, 2002). A teoria de Michaelis-Menten, se bem que seja válida para a maioria das enzimas, é uma simplificação. O complexo ES engloba um conjunto de intermediários, desde que o substrato se liga, incluindo as várias transformações que sofre, até que este se liberta.

máximo em que a velocidade é independente da concentração de substrato (isto é, por muito que se aumente $[S]$, v_0 é praticamente constante (Campos, 2002; Lima e Mota, 2003).

O facto de v_0 depender de $[S]$, tem a ver com o facto de se formar um complexo enzima-substrato (E-S) como intermediário das reacções enzimáticas. A equação que traduz o comportamento da curva de v_0 em função de $[S]$ (curva de Michaelis-Menten (figura III-13) é a equação de Michaelis-

Menten.
$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$
, em que v é a velocidade inicial

para cada concentração de substrato $[S]$, V_{\max} a velocidade máxima, que corresponde à assíntota da curva e K_M a

3.6.2. Classificação das enzimas

As enzimas podem-se dividir em seis classes principais, de acordo com o tipo de reacção catalizada (tabela III-9).

Tabela III - 9: Classificação das enzimas por classes e alguns exemplos de enzimas industriais (Campos, 2002; Olsen, 2004; Waites *et al*, 2001).

Classes	Características	Enzimas industriais
Oxirredutases	Catalizam reacções de oxidação-redução, transferência de átomos de hidrogénio, átomos de oxigénio ou electrões	Peroxidasas, catalases, Glucose-oxidases, laccases
Transferases	Catalizam a transferência de um grupo de uma molécula para outra	Fructosyl-transferases, Glucosyl-transferases
Hidrolases	Catalizam a hidrólise, ou seja, a ruptura de ligações por adição de uma molécula de água	Amilases, Celulases, Lipases, Pectinases, Proteases
Liases	Catalizam a ruptura de ligações usando outra via que não a da hidrólise e da oxidação	Pectate liases, Alpha-acetolactate, descarboxylases
Isomerases	Catalizam o reordenamento estruturas das moléculas	Glucose isomerases
Ligases ou sintetases	Catalizam a formação de novas ligações (C-O, C-N, C-S) com degradação de ATP.	<i>Não são utilizadas actualmente na indústria</i>

Os organismos produzem uma vasta variedade de enzimas; quanto ao local onde actuam podem ser classificadas em: enzimas intracelulares, envolvidas nos processos celulares; ou enzimas extracelulares que podem ser produzidas por alguns organismos, e em vez de permanecerem no interior da célula são excretadas para o meio exterior.

As enzimas extracelulares são capazes de digerir polímeros insolúveis, tais como a celulose, as proteínas, o amido, cujos produtos da digestão são, em seguida, transportados para o interior da célula, onde são utilizados como nutrientes para o crescimento (Madigan *et al*, 2000, Waites *et al*, 2001). Algumas destas enzimas podem ser utilizadas a nível industrial.

3.6.3. Enzimas microbianas e suas aplicações

Actualmente, são produzidas industrialmente grandes variedades de enzimas, que devido às vantagens que apresentam (habilidade de funcionarem a condições de pressão, temperatura e pH normais, requererem menos energia, serem biodegradáveis e poderem actuar em meios de duas fases orgânica aquosa e orgânica não aquosa) estão a sobrepor-se à produção de catalizadores químicos (Waites *et al*, 2001).

Por todas as características dos microrganismos referidas no início do capítulo, em particular pela sua fácil manipulação, as enzimas de origem microbiana são mais vantajosas e frequentes; no entanto, existem algumas enzimas de aplicação industrial com origem nos tecidos animal ou vegetal, como é o exemplo da renina, obtida do estômago de bezerros e a papaína, obtida da papaia.

Existem imensas enzimas microbianas utilizadas na elaboração de alimentos e bebidas, tratamento de peles e tecidos, fabrico de detergentes, indústria metalúrgica, aplicações na medicina (tabela III-10).

Tabela III - 10: Enzimas microbianas e suas aplicações (Madigan *et al*, 2000; Waites *et al*, 2001)

Enzimas	Fontes	Aplicação	Indústria
Amilase	Fungos	Pastelarias; Fabricação de xaropes Auxiliar digestivo	Panificação;Alimentar; Farmacêutica
	Bactéria	Revestimentos de amido; Amido de lavanderia para desengomar a frio; Remoção de revestimentos (desengomador); Detergentes	Papel; Têxtil; Química
Protease	Fungos	Pastelarias	Panificação
	Bacteria	Remoção de manchas; Amaciador de carnes; Limpeza de fermentos; Detergentes domésticos	Têxtil; Alimentar; Medicina; Química
Lipase	Bactéria	Flavorizantes alimentares; Remoção de gorduras; Limpeza de peles	Alimentar;Detergentes;Têxtil
Glucose oxidase	Fungos	Remoção de glucose, remoção de oxigénio Fitas teste para diabetes	Alimentar Farmacêutica
Glucose Isomerase	Bactéria	Xaropes	Refrigerantes
Pectinase	Fungos	Prensagem, clarificação	Vinhos e sumos de fruta

O primeiro passo no processo de obtenção de enzimas microbianas é identificar o microrganismo que produz uma enzima com especificidade catalítica apropriada e propriedades físicas desejadas. Para tal utilizam-se programas de selecção que determinam as propriedades das enzimas (pH óptimo, resistência ao calor, etc).

Os microrganismos mais utilizados para a produção de enzimas pertencem ao género *Bacillus*, *Aspergillus* e *Saccharomyces*. A sua utilização tem grandes vantagens pois a sua biologia é bastante conhecida, proporcionando segurança na manipulação dos mesmos, crescem rapidamente e são capazes de produzir grandes quantidades de enzimas, muitas das quais são extracelulares sendo excretadas para o meio de fermentação (Rajni, 2003).

- **Enzimas nos detergentes**

A incorporação de enzimas nos detergentes proporciona muitos benefícios, tais como, a redução dos gastos de energia, já que os detergentes que contêm enzimas actuam a temperaturas inferiores às que são usadas com detergentes de origem química. Além disso as enzimas ao contrário de outros componentes dos detergentes, não têm um impacto negativo no tratamento das águas residuais, visto que são rapidamente biodegradáveis, sendo seguras para o meio ambiente.

Actualmente é muito utilizada nos detergentes uma protease alcalina derivada de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* devido às suas características de pH e temperatura. As proteases não são as únicas enzimas utilizadas em detergentes podendo-se encontrar também amilases e lipases (Waites *et al*, 2001).

- **Enzimas na produção de queijo**

Durante muitos anos foram utilizadas substâncias provenientes do estômago de alguns caprinos para a produção de queijo. Estes contêm uma enzima, a renina, responsável pela hidrólise parcial da caseína (proteína do leite). Actualmente, esta foi substituída por algumas proteases com propriedades semelhantes à renina produzidas por *Rhizomucor niehei* ou *Rhizomucor pusillus* (Waites *et al*, 2001).

Mais recentemente o gene da renina foi introduzido em vários microrganismos, incluindo *E. coli*, *Aspergillus nidulans* e *A. niger*. Apesar de, estes microrganismos serem distintos geneticamente são capazes de expressar e secretar a enzima.

As lipases são também usadas em produtos lácteos, especialmente queijos, para a hidrólise de ésteres dos ácidos gordos e acelerar o desenvolvimento do sabor.

- **Enzimas na produção de sumos**

Várias enzimas microbianas são utilizadas em processos de obtenção de sumos de fruta mas as mais importantes são as peptinases. Estes processos são desenvolvidos em substratos sólidos das espécies *A. niger* ou *Penicilium*. As frutas contêm grande quantidade de pectina que actuam como superfície ligante

para manter juntas as células. Na produção de sumos parte da pectina é extraída por pressão, aumentando assim a viscosidade do sumo, o que traz problemas na sua produção e nos processos posteriores de clarificação e filtração. Este problema pode ser resolvido adicionando peptinase à polpa da fruta antes da produção do sumo. Um tratamento semelhante é utilizado para aumentar a produção de alguns azeites (Waites *et al*, 2001).

Alguns sumos de maçã contêm fécula que deve ser degradada para produzir sumos claros e concentrados. Com a adição de amilases juntamente com peptinase é possível obter o efeito desejado. Na produção de vinhos utilizam-se enzimas comerciais com vários objectivos como por exemplo para extrair a cor da pele da uva podem adicionar-se celulasas. As frutas cítricas, como as laranjas contêm um sabor amargo que pode ser ajustado com naringinase de *A. niger*.

A glucose-oxidase de espécies como o *A. niger* actua como catalase sendo utilizada para retirar o oxigénio molecular do vinho, cerveja, sumos de fruta e refrescos prevenindo a oxidação que afecta a qualidade do produto (Waites *et al*, 2001).

- **Enzimas no fabrico têxtil**

As enzimas são utilizadas em grande escala na indústria têxtil, nos acabamentos dos tecidos e no tratamento e lavagem de peles. As enzimas como a amilase ou a celulase são muito utilizadas nesta indústria visto não serem corrosivas e não produzirem efluentes prejudiciais.

As celulasas são utilizadas em algodão e outras fibras de celulose para produzir tecidos com uma maior suavidade e brilho.

As proteases e lipases são muito utilizadas no processamento de peles. Estas enzimas são mais fáceis de usar e mais seguras que os produtos químicos. As proteases, neste caso, têm a função de cimentar as fibras e prevenir a penetração de água, suavizar e limpar as peles, as lipases são usadas para eliminar as gorduras (Waites *et al*, 2001).

3.6.4. Proteases e lipases

Seguidamente serão descritas as principais características das enzimas microbianas que foram objecto de estudo nesta investigação.

As **proteases** são uma classe de enzimas que ocupam uma posição primordial no campo das aplicações fisiológicas e comerciais. As enzimas proteolíticas catalizam a clivagem das ligações peptídicas das outras proteínas.

As proteases executam uma grande variedade de funções, desde o nível celular ao nível do organismo, produzindo um sistema de cascatas, sendo responsáveis por processos complexos que envolvem a fisiologia

normal da célula bem como em condições patofisiológicas anormais. Existem diversas fontes de proteases, tais como, as plantas, os animais e os microrganismos.

Os microrganismos representam uma excelente fonte de enzimas devido à sua vasta diversidade bioquímica e à facilidade da sua manipulação genética. As proteases microbianas representam cerca de 40% do total das enzimas comerciais (Godfrey *et al*, 1996 *in* Mala *et al*, 1998).

Muitas proteases comerciais principalmente, as neutras e alcalinas, são produzidas por organismos pertencentes ao género *Bacillus*. As proteases bacterianas neutras são activadas num pequeno intervalo de pH (5 a 8) e têm uma termotolerância relativamente baixa. A sua baixa termotolerância é uma vantagem para o controlo da duração da sua reactividade na produção de hidrolizantes alimentares com baixo grau de hidrólises. As proteases bacterianas são caracterizadas pela sua alta actividade a pH alcalino (pH=10) e a sua larga especificidade com o substrato. A sua temperatura óptima é cerca de 60°C, o que as tornam apropriadas para utilização na indústria dos detergentes.

Os fungos possuem maior variedade de enzimas que as bactérias. Por exemplo, *Aspergillus oryzae* produz proteases ácidas, neutras e alcalinas (pH de 4 a 10) que exibem uma larga especificidade com o substrato. No entanto, têm baixas taxas de reacção e têm uma baixa termotolerância quando comparadas com as enzimas microbianas.

As **enzimas lipolíticas** têm a capacidade de hidrolisar triglicerídeos, incluindo as lipases e esterases, as quais apresentam diferença em relação ao substrato. As **lipases** são enzimas que hidrolisam tri, di e monoglicerídeos presentes na interface óleo-água, ou seja, são mais específicas para substratos insolúveis na forma de emulsão, produzindo ácidos gordos livres e monoglicerídeos o que tornou possível a sua utilização em diversos processos biotecnológicos.

As lipases encontram-se amplamente distribuídas na natureza em animais, vegetais e microrganismos. As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente porque além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento a partir do meio de fermentação, são geralmente mais estáveis e com propriedades mais diversificadas.

As esterases apresentam grande actividade sobre substratos solúveis em água (Brockman *et al*, 1988 *in* Campos *et al*, 2002).

De origem animal, existem as lipases lácteas e a lipase pancreática. De origem vegetal são extraídas da soja, do centeio e do algodão. As lipases microbianas podem ser produzidas por leveduras dos géneros *Candida* e *Torulopsis*, pelos fungos filamentosos *Rhizopus*, *Geotrichum* e pelas bactérias do género *Pseudomonas* e *Staphylococcus*.

A maioria das lipases de origem animal tem pH óptimo entre 8 e 9, dependendo das condições de hidrólise, enquanto que as de origem microbiana têm pH óptimo entre 5,6 a 8,5. Na maioria dos casos essas

lipases são extracelulares, permitindo a sua extracção, isolamento e purificação por métodos relativamente simples (Borgston & Brockman, 1984 *in* Campos *et al*, 2002).

Embora as lipases possam ser produzidas em larga escala, essas enzimas têm uma utilização restrita na maioria das indústrias. Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de otimizar os processos de modificação de óleos de gorduras catalizados por lipases: esses incluem a imobilização da enzima, estudos cinéticos e desenvolvimento de biorreactores.

3.7. Etapas de um processo industrial de Biotecnologia Microbiana

As fases típicas de um processo de Biotecnologia Microbiana envolvem diferentes etapas. Neste sub-capítulo e tendo em conta todos os pontos atrás referidos, é feita uma descrição pormenorizada das várias etapas de um processo biotecnológico (Figura III-14)

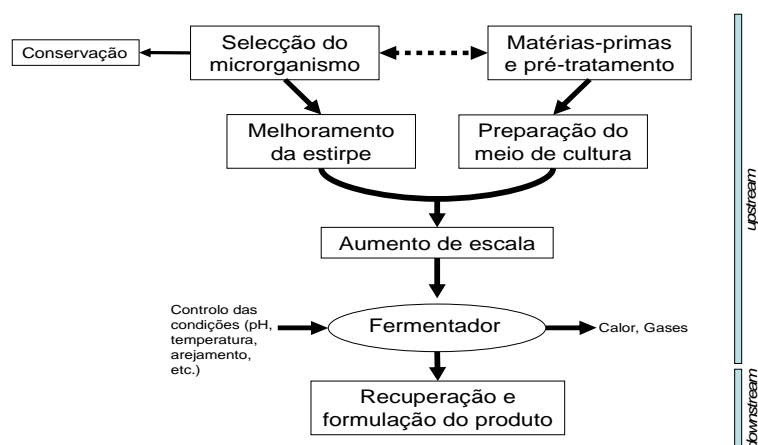


Figura III - 14: Esquema simplificado de um processo industrial de Biotecnologia Microbiana (adaptado de Lima e Mota, 2003 and Waites *et al*, 2001)

3.7.1. Etapas “Upstream”

Estas etapas estão associadas à selecção e crescimento dos microrganismos produtores (microrganismos com interesse comercial), à preparação das matérias-primas para o meio de cultura e ao processo de fermentação (Waites *et al*, 2001).

1. Selecção/Procura de microrganismos

Qualquer processo industrial com microrganismos inicia-se com a selecção de uma ou mais estirpes microbianas. A selecção pode ser feita, quer a partir do isolamento de ambientes naturais quer pelo rastreio das características pretendidas em microrganismos existentes em colecções que podem fornecer culturas puras e estirpes com identidade certificada (por exemplo, a “American Type Culture Collection” em USA, a “Collection Nationale de Cultures de Microorganismes” do instituto Pasteur, em França).

Durante esta fase procede-se à identificação da actividade ou produto microbiano pretendido, e é iniciada com um estudo sobre os microrganismos que possam ser considerados potencialmente interessantes, para uma caracterização mais cuidada.

O microrganismo produtor tem, desta forma, que possuir características específicas, determinadas pela sua estrutura genética e metabolismo:

- Deve ser geneticamente estável;
- A sua taxa de crescimento deve ser elevada;
- Deve estar livre de contaminantes;
- Deve ser de fácil conservação por largos períodos de tempo, sem a perda das suas características.
- Os seus requisitos nutricionais devem ser de custo reduzido;

Estas características poderão no entanto, modificar-se artificialmente mediante procedimentos de melhoramento de estirpes. Nestas etapas, tem-se em conta a estratégia de obtenção do microrganismo de interesse industrial, forma de preparação do inóculo e a sua conservação a longo prazo.

2. Meio de Cultura

A selecção do meio de cultura é feita tendo em conta as exigências nutricionais do microrganismo que se pretende crescer *in vitro* (Ferreira e Sousa, 1998), o pH, a tensão de oxigénio e a actividade da água, os quais devem estar dentro da gama tolerada pelo microrganismo.

Existem duas classes de meios de cultura: os meios quimicamente definidos, preparados pela adição de quantidades precisas de compostos químicos inorgânicos ou orgânicos a uma determinada quantidade de água destilada, sendo desta forma a sua composição química conhecida; e os meios complexos, frequentemente constituídos por produtos da digestão de caseína, de carne, de soja ou várias outras substâncias quimicamente indefinidas mas altamente nutritivas. A principal desvantagem destes meios é a perda de controlo em relação à composição de nutrientes (Madigan *et al*, 2000). Estes produtos estão disponíveis comercialmente na forma de pós ou granulados, que podem ser pesados e prontamente dissolvidos em água destilada, originando o meio de cultura.

3. Isolamento do Microrganismo

Quando se pretende isolar em cultura pura, a partir de amostras que provavelmente contêm diferentes grupos de microrganismos, é fundamental utilizar condições selectivas. Estas condições selectivas podem ser usadas em duas fases diferentes (Lima e Mota, 2003):

- Pré-cultura – filtração para remoção de sólidos ou de microrganismos indesejáveis e fase de enriquecimento no grupo de microrganismos pretendidos (escolha de pH, temperatura, substrato, inibidores específicos de microrganismos indesejáveis);
- Cultura – orientada para evidenciar as estirpes com a actividade pretendida.

Um dos principais métodos para a obtenção de culturas puras e avaliação da sua pureza é a utilização de meios de cultura sólidos, especificamente de meios sólidos acondicionados em placas de Petri (Madigan *et al*, 2000). Os meios sólidos imobilizam as células permitindo a obtenção de colónias visíveis. As colónias podem apresentar várias formas e tamanhos dependendo do organismo em causa, das condições do cultivo, dos nutrientes fornecidos e de outros factores fisiológicos, tais como temperatura, pH.

Os meios de cultura sólidos são obtidos da mesma forma que os meios líquidos, excepto na adição de agar, utilizado como agente solidificante, normalmente a 1,5%. Em qualquer dos métodos utilizado devem-se efectuar pré-culturas a partir de uma colónia isolada, para certificação de pureza das culturas.

O isolamento pode ser efectuado a partir de:

- **Isolamento directo:** o meio de cultura que se utiliza para o isolamento deverá permitir a máxima expressão do material genético do organismo. Por exemplo, quando se pretende isolar um microrganismo produtor de antibióticos pode-se fazer crescer o potencial produtor, numa caixa de Petri, na presença de microrganismos sensíveis à acção do antibiótico pretendido, observando-se a produção do antibiótico pela formação de zonas de inibição do crescimento do microrganismo sensível.
- **Enriquecimento do cultivo:** esta técnica consiste em aumentar de uma população mista o número de microrganismos de interesse em relação aos restantes. Desta forma, favorece-se o crescimento de um dado microrganismo mediante condições adequadas ao mesmo, ou inapropriadas para o desenvolvimento de outros microrganismos. Para tal, utilizam-se substratos específicos ou certos inibidores. Este procedimento permite a dominância do microrganismo com interesse facilitando o seu isolamento em meio sólido.

4. Melhoramento da estirpe

As estirpes seleccionadas e isoladas são melhoradas posteriormente, de forma a aumentar a produtividade do processo ou as características do microrganismo directamente relacionadas com a recuperação

do produto (Lima e Mota, 2003). As modificações feitas no microrganismo em questão têm sempre em conta o factor económico.

A quantidade de metabolitos produzidos pelas estirpes selvagens é geralmente muito baixa devido a mecanismos de autoregulação do metabolismo, o objectivo do melhoramento é aumentar o fluxo metabólico, no sentido da produção do produto desejado.

Uma forma de melhorar o rendimento é mediante a optimização do meio de cultura e as condições de cultura, mas este método está limitado às capacidades de síntese do produto desejado pelo microrganismo em questão. Uma outra possibilidade é o melhoramento genético do microrganismo. Como já foi referido, o potencial de produtividade de um organismo é dependente do seu genoma, este ao ser modificado poderá aumentar o rendimento de produção de determinado metabolito de interesse (Waites *et al*, 2001).

Estirpes modificadas geneticamente podem ser obtidas por uma das seguintes formas:

- **Seleção natural de variantes** – técnicas de estudos das mutações espontâneas, embora a sua frequência seja entre 10^{-6} a 10^{-9} por genoma e por geração.
- **Mutação induzida** – técnica mais comum, possui a vantagem de conduzir a resultados rápidos e sustentáveis ao longo do tempo, apesar da falta de conhecimento detalhado sobre a fisiologia do microrganismo produtor. Como já referido, as estirpes microbianas podem ser submetidas a tratamentos físicos ou químicos de mutação, alterando, desta forma, alguma porção do genoma de forma a aumentar a produção de um determinado metabolito; no entanto, estas mutações podem também diminuir ou inibir a produção do composto pretendido.
- **Recombinação genética** – um microrganismo pode ser dotado com uma capacidade genética devido à inserção de um gene ou conjunto de genes, sendo possível, desta forma, produzir metabolitos que do ponto de vista genético da sua espécie não seriam possíveis.

5. Conservação da estirpe de interesse

Uma vez obtida a cultura pura, esta deve manter-se em laboratório em culturas stock por períodos que podem variar de algumas semanas a vários anos, dependendo do microrganismo em causa e da técnica usada. As culturas stock devem ser mantidas de modo a que os microrganismos permaneçam viáveis, geneticamente homogéneos e protegidos de posteriores contaminações (Ferreira e Sousa, 1998).

A conservação de estirpes com interesse tem os seguintes objectivos:

- Preservar a pureza genética do cultivo sem perda de nenhuma das suas propriedades bioquímicas;
- Preservar os níveis de produtividade inicial;
- Permitir que a estirpe possa ser transportada e manejada com facilidade.

O conhecimento das características da estirpe seleccionada é essencial para a escolha do método de conservação. Existem diversos métodos de conservação de microrganismos, a sua aplicação varia com o grupo de microrganismos em questão e com as suas características específicas. Os métodos mais importantes são:

- **Repicagem contínua** – Este é um método comum de conservação, que consiste na repicagem periódica da cultura em meio nutritivo fresco. O intervalo de transferência varia de acordo com o microrganismo em questão, devendo considerar-se também o meio adequado para cada espécie. Uma vez feitas as culturas mantêm-se a 4°C durante cerca de 15 dias a 2 meses. Existem alguns inconvenientes para esta técnica uma vez que, pode aumentar a possibilidade de mutações com cada transferência, levando a perda de características do organismo; e o risco de contaminação e alterações no meio de cultura, durante o tempo que está a 4°C levando a uma dissecação gradual do mesmo.
- **Congelação** – A actividade metabólica de uma célula reduz-se consideravelmente quando mantida a temperaturas muito baixas, a congelação é desta forma, uma técnica para a conservação. Existem diferentes técnicas de congelação, a mais eficaz é a **crioconservação**, esta técnica é, normalmente, aplicada quando o crescimento da cultura se encontra na sua fase estacionária, visto que, nesta fase as células são mais resistentes aos danos provocados pelo processo de congelamento e descongelamento. Também é aconselhável utilizar uma densidade celular elevada, visto que, parte das células da cultura lisam e libertam substâncias crioprotectoras que protegem as restantes células aumentando a percentagem de sobreviventes. Para aumentar a viabilidade desta técnica as células são por vezes ressuspensas directamente num agente crioprotector ou é utilizado o agente como aditivo do meio de cultura, o agente mais utilizado é o glicerol a 10%, podendo também ser utilizado o dimetilsulfóxido, a glucose, os dextranos, a sacarose, soros de queijo, lactose, entre outros. Esta técnica encontra-se entre temperaturas de -70°C a 196°C é a técnica mais dispendiosa e com taxas de sobrevivência e estabilidade fenotípica e genética mais elevadas. No caso, do azoto líquido a conservação pode prolongar-se por vários anos.

Existe também a técnica de **refrigeração**, com viabilidade reduzida na qual as temperaturas oscilam entre -4 e -8°C, usada em culturas “slant” de agar.

- **Liofilização** – mais acessível e conveniente em termos de espaço que exige, mas com resultados mais fracos relativamente à sobrevivência de alguns microrganismos. Esta técnica envolve o congelamento e posterior secagem no vazio, a qual resulta na sublimação da água da suspensão celular, a cultura fica assim no recipiente inicial fechado no vazio no momento da secagem. A vantagem deste método é a facilidade de manter facilmente a cultura à temperatura ambiente sem perder significativamente a viabilidade. A liofilização é apropriada para a conservação de muitas bactérias sendo que as de Gram

positivas sobrevivem melhor que as de Gram negativas. Também é uma técnica usada na conservação de esporos (actinomicetes, muitos fungos). No entanto, a liofilização produz danos nas células, sendo estes por vezes reversíveis embora necessitem tempo de recuperação que é variável em função do dano. Para a rehidratação da cultura pode-se utilizar água destilada esterilizada ou meio de cultura semelhante ao utilizado para o crescimento inicial da cultura.

- **Secagem em terra estéril, areia, sílica gel ou papel de filtro** – métodos adequados para microrganismos que produzem esporos vegetativos. No caso da terra esta pode ser inoculada com uma cultura e incubada vários dias para induzir esporulação. Posteriormente a terra é seca e a cultura mantida desta forma num ambiente seco ou no frigorífico.

6. Processo de Fermentação: Biorreactores

O termo fermentação é referido no sentido de produção a grande escala de determinado metabolito, não no seu sentido fisiológico. O processo de fermentação ocorre num recipiente denominado biorreactor, este é sem duvida um dos equipamentos fundamentais da Microbiologia industrial, pode ser submetido a agitação para introduzir o oxigénio necessário para o microrganismo aeróbicos e para manter uma consistência homogénea do meio e facilitar ao microrganismo a acessibilidade aos nutrientes (Waites *et al*, 2001). Este processo deve ser adaptado às características do microrganismo de maneira a que o metabolismo deste responda com a formação do produto que se pretende, o que exige condições controladas. A estrutura de um biorreactor (material, forma, sistema de agitação, duração da fermentação) tem uma influência decisiva nos resultados finais. No subcapítulo seguinte será abordado de uma forma mais pormenorizada os princípios de um biorreactor.

3.7.2. Etapas de “Downstream”

Nesta fase ocorrem as etapas de purificação do produto, preparação do mesmo para a comercialização, tratamento dos efluentes e resíduos gerados. Os produtos da fermentação industrial podem ter natureza muito variada, desde simples moléculas como o etanol e o metanol ou compostos químicos complexos como os antibióticos ou proteínas de elevado peso molecular ou polissacarídeos complexos como os dextranos.

Cada produto necessita de um procedimento experimental de extracção específico que permita separá-lo do meio de cultivo usado e das células do microrganismo produtor, pelo que se devem desenvolver processos adequados para cada um deles. Por exemplo, os antibióticos podem ser purificados mediante extracção com compostos orgânicos, acetona, etanol, butanol, cromatografia, precipitação, cristalização, entre outros. No fim do processo as células não se podem libertar directamente para o ambiente uma vez que estas estirpes seleccionadas são muitas vezes modificadas geneticamente contendo genes de resistência a antibióticos e

portanto não devem, em nenhuma situação, serem libertadas directamente para o meio ambiente (Waites *et al*, 2001).

3.8. Biorreactores

Os biorreactores representam a última etapa da produção de metabolitos em, por exemplo, culturas de células microbianas, células vegetais, tecidos ou órgãos de plantas. Estes permitem ampliar e controlar as condições de cultivo, podendo estar associado a sistemas automáticos levando a reduções de tarefas e custos de produção do composto pretendido a grande escala.

Existem várias considerações a ter em conta na ampliação de escala em sistemas microbianos, entre os quais podemos salientar o suprimento de nutrientes, a uniformidade da mistura, a adequada transferência de gases (por exemplo, o oxigénio e o gás carbónico), a homogeneidade do sistema durante todo o tempo necessário para o cultivo no biorreactor; falhas nas considerações atrás referidas podem levar à sedimentação e morte das células comprometendo o processo de fermentação (Waites *et al*, 2001)

Um biorreactor é sem dúvida um dos equipamentos fundamentais na Microbiologia industrial, neste ocorrem muitos processos biotecnológicos, sendo necessário que haja um rigoroso controlo dos parâmetros que afectam o crescimento celular e a síntese de produtos, é necessário que se assegure um ambiente uniforme e adequado à cultura.

Um biorreactor permite realizar uma série de procedimentos essenciais à amplificação da cultura (Pirt, 1975):

- Mantém as células uniformemente distribuídas em todo o volume da cultura a fim de prevenir a sedimentação ou a flutuação das células;
- Mantém constante e homogénea a temperatura;
- Minimiza os gradientes de concentração de nutrientes;
- Adiciona oxigénio a uma velocidade adequada ao consumo do mesmo;
- A arquitectura do biorreactor deve ser tal que permita manter o cultivo puro; uma vez que todo o sistema é previamente esterilizado e posteriormente adicionada a cultura.

É portanto necessário recorrer a processos de optimização da produção de metabolitos para que os resultados sejam os esperados.

Um biorreactor pode se utilizado em “**Batch**” ou seja, em descontínuo, em que todos os componentes são colocados no meio desde o início do processo, desta forma as condições da cultura não são mantidas, o

substrato catabólico ou algum dos nutrientes essenciais à espécie em causa esgota-se, as condições do meio de cultura tornam-se inadequadas ao metabolismo do microrganismo devido à acumulação de metabolitos excretados, que atingem concentrações tóxicas ou alteram as condições do meio (ex. pH), tornando-se este, inibitório do crescimento das espécies em cultura. Em “**Batch alimentado**”, onde a alimentação dos componentes do meio se processa de uma forma controlada durante o processo, sendo desta forma proporcionadas as condições nutricionais ou ambientais necessárias para a continuidade do processo. Ou então, pode ser utilizado um biorreactor contínuo, “**Cultivo contínuo**”, no qual o meio é fornecido a uma determinada velocidade ao mesmo tempo que se retira com a mesma velocidade meio fermentado, o que permite determinar a velocidade de crescimento específico como variável independente (Pirt, 1975).

O comportamento de um microrganismo em crescimento é o resultado da interacção entre o próprio microrganismo e o meio ambiente no biorreactor. Este comportamento está dependente de factores relacionados com própria biologia do microrganismo, factores intrínsecos, e factores relacionados com o meio envolvente, factores extrínsecos. Como factores intrínsecos consideram-se as características genéticas do microrganismo e os mecanismos de regulação metabólica. Estes últimos podem ser modificados por alterações ambientais mais precisamente pelos factores extrínsecos (temperatura, pH, composição do meio, etc).

Os factores extrínsecos de natureza física são dependentes das condições de manipulação utilizadas no biorreactor como é o exemplo da temperatura, da agitação, da oxigenação, etc. Estes factores são muito importantes no decorrer do processo, por exemplo se a temperatura usada não for a adequada esta pode diminuir ou mesmo impedir a formação do metabolito pretendido, ou ainda modificar os requisitos nutritivos do microrganismo (Waites *et al*, 2001). Os componentes de um meio de fermentação devem cumprir todos os requisitos nutricionais e restantes requisitos específicos que são indispensáveis para a formação do produto.

Num processo industrial podemos considerar quatro etapas para a produção em escala de determinado microrganismo (Fiechter, 1984):

- **Propagação do cultivo**, a qual se realiza em laboratório e inicia-se geralmente num tubo de ensaio que contém um inóculo do microrganismo ou num tubo liofilizado ou congelado, onde está conservada a estirpe de interesse ou uma colónia do microrganismo previamente seleccionada.
- **Fermentação**, com o material obtido anteriormente, procede-se à incubação num recipiente de inoculação que pode ter um volume de 50 a 1000L conforme a escala industrial posterior. Do recipiente de inoculação passa-se posteriormente ao biorreactor cujo volume varia de acordo com o produto que se vai obter e a sua concentração podendo chegar aos 1 000 000L. Um processo essencial a ter em conta no início desta fase é a preparação e esterilização dos meios tanto no recipiente de inoculação como no biorreactor.

- **Processos de separação e purificação dos produtos**, estas etapas estão compreendidas em quatro passos: a) separação dos insolúveis por filtração, centrifugação, ou decantação; b) separação primária por extracção, absorção ou ultrafiltração; c) purificação por extracção líquido-líquido, ou cromatografia de afinidade e d) isolamento do produto.
- **Tratamento dos efluentes**, embora não tenha uma relação directa com o produto esta etapa é imprescindível pois é fundamental controlar o efluente que sai da fábrica que é geralmente enviado para um curso de água.

Num processo industrial é extremamente importante a qualidade de uma estirpe microbiana, esta deve ter a capacidade de produção num biorreactor e não apresentar dificuldades nas etapas de separação e purificação. Ou seja, um biorreactor e as condições de operação devem assegurar a produtividade máxima do processo e a qualidade do produto.

Tendo em conta a relação entre crescimento celular e síntese do metabolito de interesse – quando o metabolito é produzido no final da fase de crescimento, considera-se o processo de produção em duas etapas, numa primeira fase é usado um biorreactor para a formação de biomassa e seguidamente um segundo para a produção do metabolito (Fowler, 1988; Su, 1995; Bourgaud *et al.*, 2001 in <http://www2.enq.ufsc.br/teses/d009.pdf>). Quando a produção do metabolito está associada ao crescimento celular, é efectuada uma única etapa para o crescimento das células e formação dos produtos ao mesmo tempo (Bourgaud *et al.*, 2001 in <http://www2.enq.ufsc.br/teses/d009.pdf>).

No caso do metabolito permanecer no interior da célula, é necessário, lisar as células para que os produtos sejam recuperados, este processo é normalmente efectuado em processos fermentativos do tipo “Batch” ou “Batch alimentado”. Os produtos extracelulares podem ser recuperados a partir do meio de cultivo. Neste caso, pode recorrer-se a um cultivo contínuo, o qual representa maior produtividade frente aos outros processos (Bourgaud *et al.*, 2001 in <http://www2.enq.ufsc.br/teses/d009.pdf>).

Para o cultivo de células livres, que é o caso do cultivo de microrganismos, existem dois tipos de biorreactores: os **biorreactores mecanicamente agitados** (com agitação com pás ou hélices) e os biorreactores pneumáticamente agitados como os **biorreactores “air lifts”** e coluna de bolhas (Wilson e Hilton, 1995 in <http://www2.enq.ufsc.br/teses/d009.pdf>).

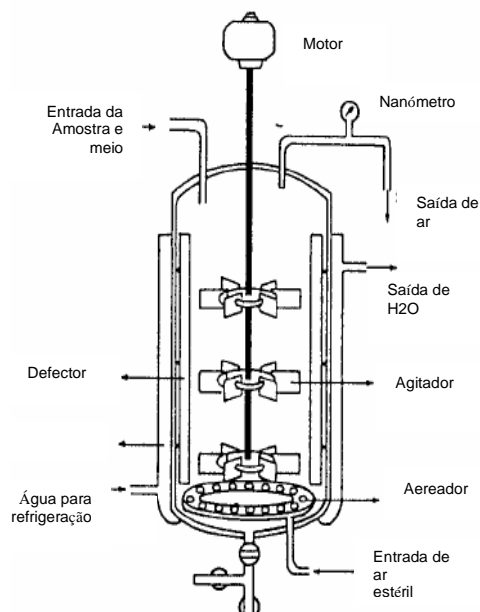


Figura III - 15: Esquema de um biorreator mecanicamente agitado (Pirt, 1975).

Os biorreactores que serviram de base para a construção do biorreator de pequena escala utilizado nas actividades laboratoriais desenvolvidas foram os mecanicamente agitados (figura III-15). Nestes o ar é injectado pela parte inferior do recipiente e é distribuído por uma coroa que possui pequenos orifícios equidistantes. O ar que sai de cada orifício é movimentado pelas paletas da turbina inferior gerando pequenas bolhas de ar, a partir das quais se difunde o oxigénio por todo o meio. O sistema de agitação completa-se com quatro ou seis defectores que têm a finalidade de contrariar o movimento circular que as turbinas transferem ao líquido gerando desta forma uma maior turbulência e maior mistura. O recipiente é revestido por uma capa pela qual circula água, permitindo um maior controlo da temperatura, para

biorreactores maiores o controlo é feito de outras formas mais complexas. O ar que entra no biorreator deve estar estéril, o que é assegurado fazendo-o passar por um filtro cujo diâmetro do poro deverá ser $0,45\mu\text{m}$, o que impede a passagem de microrganismos e esporos (Pirt, 1975).

Capítulo IV

Apresentação e análise dos resultados dos questionários

1. Introdução

Neste capítulo, apresentam-se os dados obtidos nos questionários elaborados, com vista a alcançar o objectivo 2 proposto para este estudo (ver capítulo I, pág. 21). Os questionários, como referido anteriormente, visam recolher opiniões de professores do 11º grupo B acerca da importância do ensino da Biotecnologia e da Microbiologia e da aplicação do Trabalho Prático como ferramenta didáctica no ensino secundário (12º ano).

A avaliação de algumas respostas (e.g. necessidade de aplicação de Trabalho Prático, equipamento disponível nas escolas), contribuiu para a selecção/adaptação dos procedimentos experimentais desenvolvidos no âmbito deste trabalho (objectivo 3, ver capítulo I, pág. 21).

Embora o trabalho tenha sido inicialmente programado apenas para a Amostra 1 (grupo de professores a leccionarem em diferentes escolas, de zonas diferentes do país), surgiu a hipótese de aplicar e enriquecer o trabalho com outro grupo de professores (Amostra 2), que se encontravam a realizar uma acção de formação na mesma área de estudo desta dissertação (o ensino da Biotecnologia). A caracterização geral destas amostras (distrito, cidade, escolas em que leccionam e número de professores inquiridos) é apresentada no capítulo II (pág.25).

A discussão dos resultados obtidos será feita no capítulo VI e sempre que possível, baseada na literatura consultada.

Para tornar a apresentação mais clara, este capítulo está organizado tendo em conta:

- a apresentação e análise dos resultados do questionário de opiniões distribuído aos Professores do 11º grupo B – **Amostra 1 (35 indivíduos)**;
- a apresentação e análise dos resultados do questionário de opiniões distribuído aos Professores do 11º grupo B, no final da acção de formação “*Manipulação de ADN – Desafios no Novo Programa de Biologia do 12º ano*” (vocacionada, assim, para o ensino da Biotecnologia no 12º ano) que decorreu em Abril 2006, no Centro de Formação das Escolas do Concelho de Ílhavo com a formadora Dr.ª Tina Lopes, - **Amostra 2 (13 indivíduos)**
- a análise dos dados obtidos no questionário considerando ambas as amostras;

Finalmente, salienta-se ainda que, sempre que possível, faz-se uma interpretação dos resultados obtidos para cada questão, com vista a simplificar a discussão mais geral (onde será efectuada uma articulação entre os resultados obtidos) que é apresentada no capítulo VI.

2. Descrição e análise dos resultados

Nesta secção são apresentados os resultados obtidos no questionário de opiniões da Amostra 1 e da Amostra 2. A análise terá essencialmente um carácter quantitativo.

2.1. Resultados do Questionário de Opiniões

1ª Parte – Caracterização dos inquiridos

O objectivo desta primeira parte do questionário é caracterizar a população de professores inquiridos quanto a idade, sexo, anos de serviço e disciplinas que leccionam. A análise é feita no total dos inquiridos (48 indivíduos), salvaguardando, sempre que oportuno, diferenças entre a Amostra 1 e a Amostra 2.

Questão B: Idade dos inquiridos

A informação da idade dos inquiridos foi recolhida na forma de intervalos, tal como é representado na tabela que se segue (tabela IV - 1).

Tabela IV – 1: Distribuição do número de inquiridos por intervalos de idade definidos

Intervalos de idade dos inquiridos (anos)	Amostra 1 (nº. de inquiridos)	Amostra 2 (nº de inquiridos)	Amostra 1+2 (nº de inquiridos)
18-25	0	0	0
26-35	8	1	9
36-45	10	11	21
46-55	15	1	16
Mais de 55	2	0	2
Totais	35	13	48

Verifica-se que, no total das amostras, o grupo mais representado (21 no total de 48 inquiridos) tem idades compreendidas entre os 36 e 45 anos, seguido do grupo entre os 46 e 55 anos (16 no total de 48 inquiridos). No entanto, a Amostra 1 é mais heterogénea, sendo o grupo etário mais representativo aquele que compreende idades entre os 46 e os 55 anos (15 indivíduos), havendo 8 inquiridos com idades entre os 26 e os 35 anos, 10 inquiridos entre os 36 e 45 anos e, ainda, 2 indivíduos com mais de 55 anos. A Amostra 2, apresenta maior homogeneidade com a grande maioria (11 em 13 inquiridos) com idades entre os 36 e 45 anos.

Questão C: Sexo dos inquiridos

No que diz respeito ao sexo dos inquiridos, a maioria é do sexo feminino como podemos observar na tabela que se segue. Do total dos 48 inquiridos, 42 são do sexo feminino enquanto 6 pertencem ao sexo masculino (tabela IV-2).

Tabela IV – 2: Distribuição do número de inquiridos segundo o sexo.

Sexo dos inquiridos	Amostra 1 (nº. de inquiridos)	Amostra 2 (nº de inquiridos)	Amostra 1+2 (nº de inquiridos)
Masculino	5	1	6
Feminino	30	12	42
Totais	35	13	48

Questão D: Número de anos de serviço

A tabela que se segue mostra a distribuição do número dos inquiridos da Amostra 1 e Amostra 2 e total pelos intervalos de anos de serviços definidos no questionário.

Tabela IV – 3: Distribuição do total dos inquiridos segundo o número de anos de serviço

Intervalos de anos de serviço dos inquiridos	Amostra 1 (nº. de inquiridos)	Amostra 2 (nº de inquiridos)	Amostra 1+2 (nº de inquiridos)
0-3	0	0	0
4-6	1	0	1
7-25	23	13	36
26-35	11	0	11
36-40	0	0	0
Totais	35	13	48

A maioria dos inquiridos apresenta 7 a 25 anos de serviço (23 inquiridos na Amostra 1 e 13 inquiridos na Amostra 2). Analisando a tabela de dados (anexo V) e relacionando a idade dos inquiridos e os anos de serviço verificar-se que, na maioria dos casos, quanto maior a idade mais anos de serviço os inquiridos apresentam. Existem, no entanto, dois inquiridos com um baixo número de anos de serviço em relação à sua idade o que levanta a hipótese de que a sua carreira como docente foi iniciada mais tarde.

Questão E: Distribuição das disciplinas leccionadas no ano lectivo (2005/2006) pelo total dos inquiridos

Quanto às disciplinas leccionadas durante este ano lectivo (2005/2006) pelos professores inquiridos, verifica-se que a maioria destes lecciona mais que uma disciplina (o que justifica um total superior a 100%),

(figura IV-1). As disciplinas de Ciências Naturais e de Biologia (12º Ano) são as mais referidas, 47,9% e 35,4% do total dos professores inquiridos, respectivamente.

Ao analisar o gráfico (figura IV-1), verifica-se que 35,4% do total dos inquiridos (31,4% dos professores da Amostra 1 e 46,2% da Amostra 2) leccionam actualmente Biologia do 12º Ano.

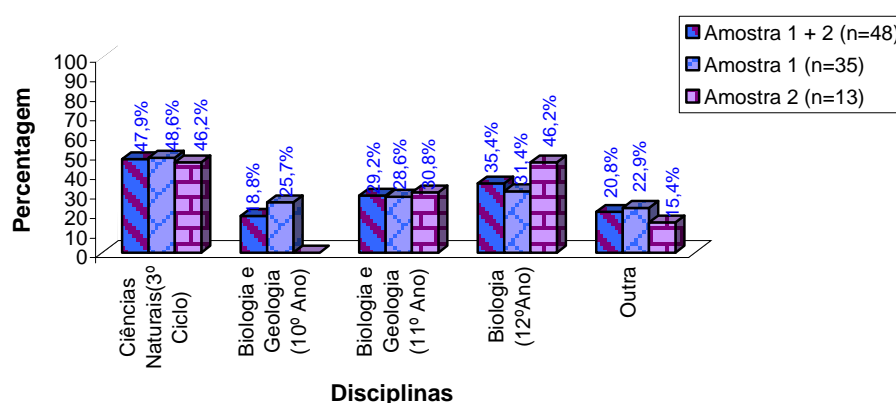


Figura IV – 1: Distribuição das disciplinas leccionadas no presente ano lectivo pelo total dos professores inquiridos. A categoria “Outra” refere-se às disciplinas de Biologia Humana (10º Ano do curso Tecnologia de Desporto), TLB III (12º Ano), Ciências do Ambiente e Ciências Naturais (Ensino Recorrente), Geologia (12º Ano) e Saúde e Socorrismo (10 e 11º Ano).

2ª Parte – Ensino das Ciências em particular da Biotecnologia e Microbiologia

A segunda parte do questionário tem por objectivo conhecer a opinião dos inquiridos acerca da importância do ensino das Ciências, em particular da Biotecnologia e Microbiologia no ensino secundário e na sociedade actual e classificar os obstáculos que possam existir na implementação do ensino da Biotecnologia. Para o efeito, as respostas recolhidas são analisadas (salvaguardando, sempre que oportuno, as diferenças entre as duas amostras).

Algumas questões, devido à sua complementaridade, são agrupadas de forma a tornar a sua análise mais clara. Desta forma, a análise das respostas é orientada no sentido de nos conduzir a um melhor conhecimento das opiniões dos professores inquiridos.

Questão F: O ensino das Ciências, em particular da Biotecnologia e Microbiologia

Nesta questão, pede-se a opinião dos inquiridos em relação a uma série de afirmações que dizem respeito ao ensino das Ciências, em particular da Biotecnologia e Microbiologia, no ensino secundário. Para tal foi utilizada uma escala que permite analisar os dados recolhidos de forma quantitativa. Esta escala denomina-se escala de “Likert”, que consiste na apresentação de uma série de proposições, devendo o inquirido, em relação a cada uma delas, indicar uma das cinco posições: “concorda totalmente”, “concorda”, “sem opinião”,

“discorda”, “discorda totalmente”. Esta técnica tem vantagens relativamente a outras técnicas de construção de escalas de atitudes, que se prendem com um maior grau de fidelidade (Carmo e Ferreira, 1998).

Questão F1: O ensino das Ciências tem a responsabilidade de ajudar cada cidadão a desenvolver as suas capacidades face às novas exigências da sociedade.

No que se refere à concordância dos inquiridos com a afirmação: “O ensino das Ciências tem a responsabilidade de ajudar cada cidadão a desenvolver as suas capacidades face às novas exigências da sociedade” o gráfico da figura IV – 2, mostra que 68,8% do total dos inquiridos “concorda totalmente” com a afirmação (62,9% dos inquiridos da Amostra 1 e 84,6% dos inquiridos da Amostra 2), e que o somatório das respostas “concordo totalmente” e “concordo” do total dos inquiridos é de 97,9%.

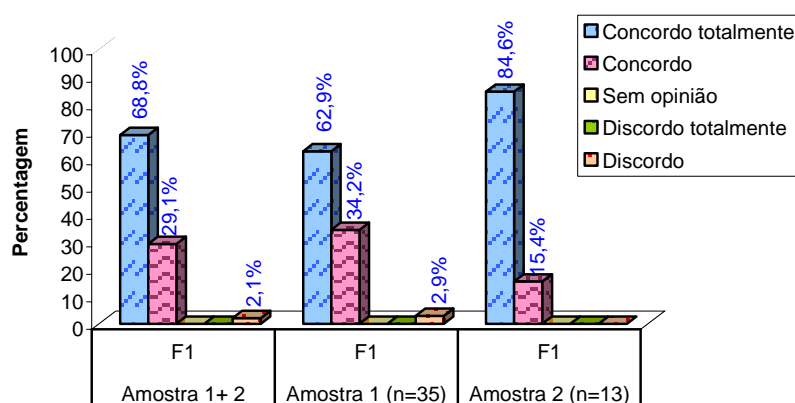


Figura IV – 2: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente à afirmação F1- O ensino das Ciências tem a responsabilidade de ajudar cada cidadão a desenvolver as suas capacidades face às novas exigências da sociedade

Somente um inquirido pertencente à Amostra 1 discorda da afirmação. Numa análise mais pormenorizada, verifica-se que o professor que discorda tem idade superior a 55 anos com tempo de serviço entre 26 e 35 anos e lecciona actualmente Ciências Naturais do 3º Ciclo e Biologia e Geologia do 10º ano de escolaridade (anexo V). No entanto não se dispõem de dados que justifiquem a sua resposta.

Questão F2: É de grande interesse promover o ensino da Biotecnologia aos alunos do ensino secundário e Questão F3: É de grande interesse promover o ensino da Microbiologia aos alunos do ensino secundário.

Devido à complementaridade das questões F2 e F3 optou-se por agrupar num mesmo gráfico o resultado de ambas, facilitando assim a sua análise (figura IV-3).

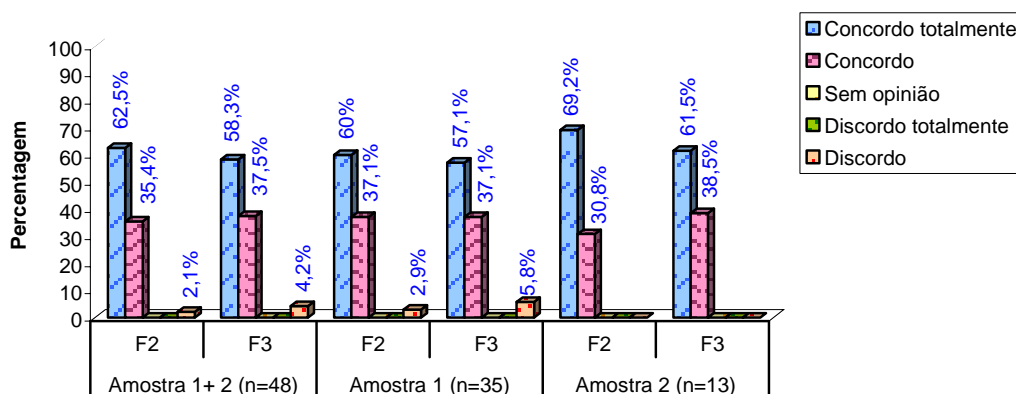


Figura IV – 3: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente às afirmações – F2: É de grande interesse promover o ensino da Biotecnologia aos alunos do ensino secundário e F3: É de grande interesse promover o ensino da Microbiologia aos alunos do ensino secundário

Observando o gráfico da figura IV-3 é evidente que a esmagadora maioria (97,9% para a questão F2 e 95,8% para a questão F3) do total dos inquiridos “concorda”ou “concorda totalmente” com a promoção do ensino da Biotecnologia e da Microbiologia. Existe, assim, por parte dos inquiridos, um grande interesse em promover estas áreas científicas no ensino secundário o que vai de encontro ao interesse manifestado na questão anterior. Acresce que, em ambas as amostras, predomina a categoria “concorda totalmente” (superior a 60% dos inquiridos para o ensino da Biotecnologia e superior a 57% no ensino da Microbiologia).

Na Amostra 1 surge um inquirido que discorda da importância do ensino da Biotecnologia e dois no ensino da Microbiologia, não existindo, contudo, dados concretos que permitam explicar esse resultado.

A maior percentagem na Amostra 2 de inquiridos na categoria de resposta “concordo totalmente” face ao ensino da Biotecnologia (69,2%) pode ser explicada pelo facto desta amostra, ao ter realizado a acção de formação nessa área, ter sido influenciada e sensibilizada para a importância do ensino da Biotecnologia no Ensino secundário.

Tendo em conta a escala utilizada (escala de “Likert”) é possível verificar que quando comparados os resultados da questão F1 (figura IV-2) com os resultados das questões F2 e F3 (figura IV-3) de cada uma das amostra existe uma valorização da questão F1 pela Amostra 2.

Questão F4: O ensino da Biotecnologia promove uma sociedade mais aberta ao desenvolvimento e à mudança e Questão F5: O ensino da Biotecnologia desenvolve nos alunos a capacidade de enfrentar algumas questões científico-tecnológicas da actualidade

No que concerne as questões F4 e F5, nas quais é feita a relação entre o domínio conceptual e o domínio atitudinal da sociedade e do aluno em particular, obtiveram-se os resultados apresentados no gráfico que se segue (Figura IV-4).

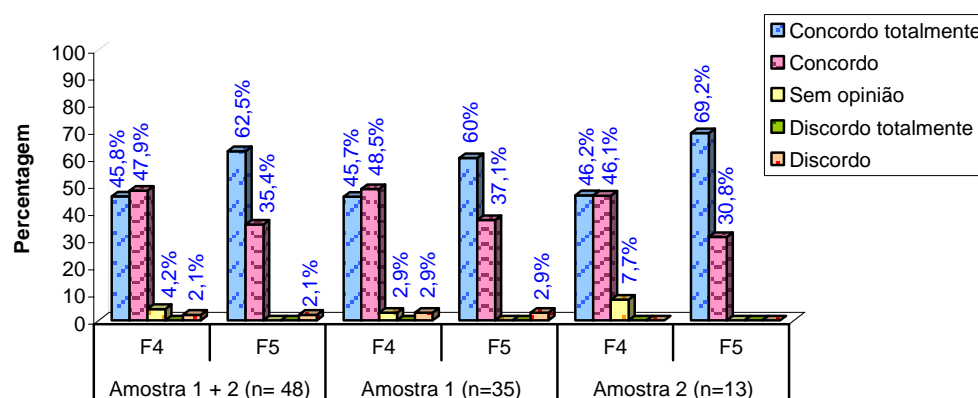


Figura IV – 4: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente às afirmações – F4: O ensino da Biotecnologia promove uma sociedade mais aberta ao desenvolvimento e à mudança e F5: O ensino da Biotecnologia desenvolve nos alunos a capacidade de enfrentar algumas questões científico-tecnológicas da actualidade

O somatório dos resultados da categoria “concordo” e “concordo totalmente” na questão F4 mostra que uma esmagadora maioria do total dos inquiridos (93,7%) considera que o ensino da Biotecnologia promove uma maior abertura dos cidadãos ao desenvolvimento. Nesta questão os inquiridos dividem-se, de forma semelhante pelas categorias de resposta “concordo” e “concordo totalmente”(47,9% e 45,8%, respectivamente).

Na questão F5 o número do total dos inquiridos que “concorda totalmente” com a afirmação é superior a 60% (62,5%) e, tal como na questão F4, o somatório desta categoria de resposta com a categoria de resposta “concordo” supera os 90%, sendo de 100% para a Amostra 2. Assim, é praticamente consensual, entre os inquiridos, que o ensino da Biotecnologia desenvolve nos alunos/cidadãos capacidades de enfrentar questões científico-tecnológicas.

Em resumo, verifica-se que o total dos inquiridos valoriza mais a afirmação F5 (62,5% dos inquiridos “concorda totalmente”) em relação à F4 (45,8% dos inquiridos “concorda totalmente”). Uma possível explicação para esta diferença pode estar relacionada com a natureza mais abrangente da questão F4 (por exemplo em aspectos de cidadania) o que pode ter inibido alguns inquiridos a expressarem uma concordância total, enquanto

que a F5 se pode considerar mais específica e enquadrada no campo de experiência profissional dos professores.

Questão F6: É importante reflectir com os alunos os aspectos biológicos, éticos e sociais relacionados com a Biotecnologia e **Questão F7:** O professor deve auxiliar o aluno a desenvolver uma atitude responsável e crítica face a questões éticas associadas à Biotecnologia

Para a questão F6 os resultados obtidos são homogêneos entre ambas as amostras (74,3% e 69,2% dos inquiridos da Amostra 1 e 2, respectivamente, “concorda totalmente” com a afirmação). O somatório deste grupo (“concorda totalmente”) com o grupo de inquiridos que “concorda” atinge os 100%.

Relativamente à questão F7 predomina, mais uma vez, a categoria “concorda totalmente”, que somada com a categoria “concorda” atinge, tal como na questão F6, 100%. Esta uniformidade na concordância mostra que os inquiridos estão cientes da importância não só em discutir com os alunos aspectos biológicos/éticos/sociais, mas também auxiliá-los neste complexo processo. Estes resultados são coerentes com o que era esperado, sendo contudo interessante ressaltar que na Amostra 2 a percentagem de inquiridos que “concorda totalmente” com a afirmação F7 é cerca de 20% superior à dos inquiridos que responderam da mesma forma na Amostra 1 (figura IV-5).

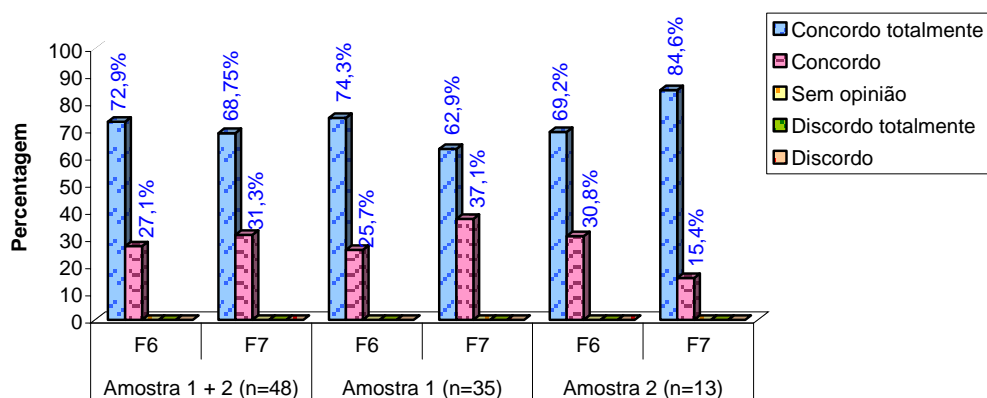


Figura IV – 5: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente às afirmações – F6 É importante reflectir com os alunos os aspectos biológicos, éticos e sociais relacionados com a Biotecnologia e F7: O professor deve auxiliar o aluno a desenvolver uma atitude responsável e crítica face a questões éticas associadas à Biotecnologia

Questão G: Obstáculos no ensino da Biotecnologia nas escolas**Questão G1: Considera que existem obstáculos no ensino da Biotecnologia?**

A maioria dos inquiridos considera haver obstáculos no ensino da Biotecnologia (figura IV-6). Esta opinião é mais evidente na Amostra 1 (88,6%), relativamente à Amostra 2 (61,5%); saliente-se que nesta última, 38,5% dos inquiridos acredita não haver obstáculos ao ensino desta área nas escolas.

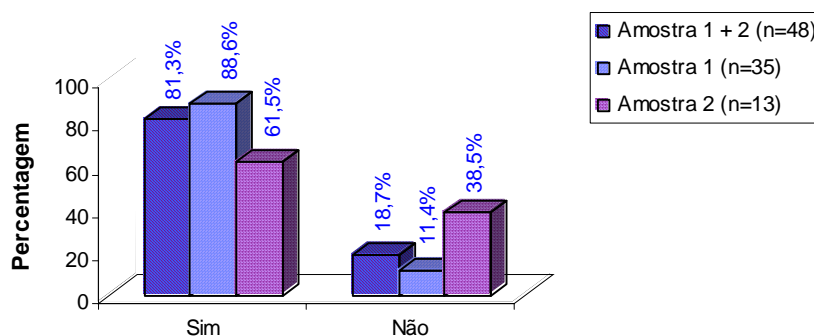


Figura IV - 6: Representação gráfica da resposta dos inquiridos à existência de obstáculos no ensino da Biotecnologia.

Questão G2: Classificação dos obstáculos no ensino da Biotecnologia

Na questão G2 foi pedido aos inquiridos que, se consideraram existirem obstáculos no ensino da Biotecnologia nas escolas, ordenassem cada item, da questão do maior obstáculo para o menor, de acordo com a sua posição pessoal. Seguidamente apresentam-se dois gráficos (figura IV-7 e IV-8) com os resultados obtidos.

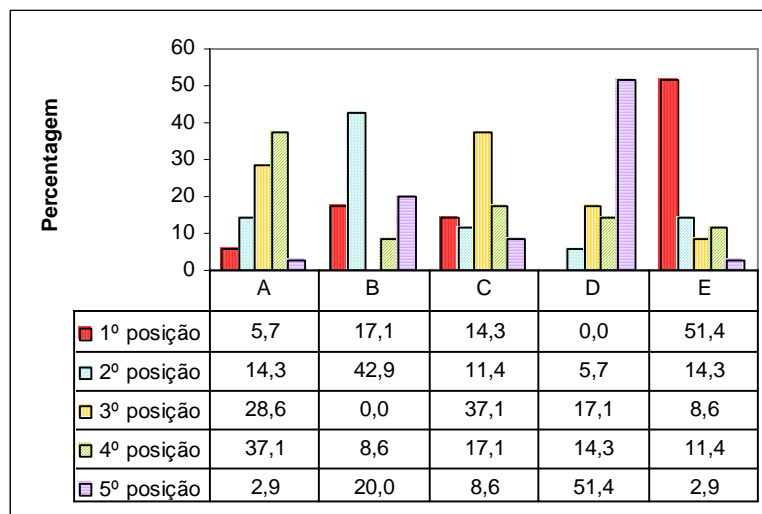


Figura IV - 7: Representação gráfica da posição dos inquiridos da **Amostra 1**, face aos obstáculos que o ensino da Biotecnologia pode apresentar. A- A complexidade dos temas associados a estas áreas; B - A sua implementação demasiado dispendiosa; C - Esta área não se encontra dentro do campo de experiência/conhecimento do professor; D - Pode ser muito controverso, devido a factores éticos e morais; E - A falta de material/equipamentos nas salas de aula.

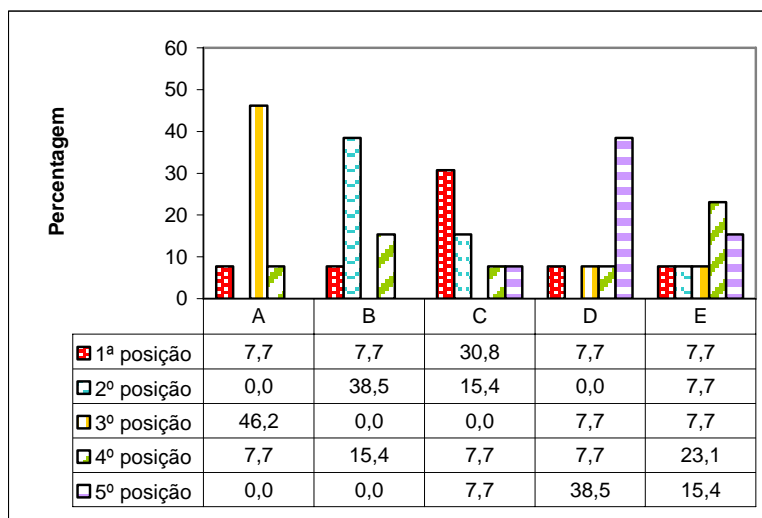


Figura IV - 8: Representação gráfica da posição dos inquiridos da **Amostra 2** face aos obstáculos que o ensino da Biotecnologia pode apresentar. A- A complexidade dos temas associados a estas áreas; B - A sua implementação demasiado dispendiosa; C - Esta área não se encontra dentro do campo de experiência/conhecimento do professor; D – Pode ser muito controverso, devido a factores éticos e morais; E – A falta de material/equipamentos nas salas de aula.

No que se refere à Amostra 1, os resultados obtidos (figura IV-7) mostram que as categorias de respostas que se relacionam com questões logísticas (**B** – “A sua implementação demasiado dispendiosa” e **E** – “A falta de material/equipamentos nas salas de aula”) são consideradas os maiores obstáculos. Assim, “A falta de equipamentos nas salas de aulas” situa-se na 1ª posição (51,4%) seguindo-se a “Implementação demasiado dispendiosa” (42,9%). Os aspectos relacionados com a formação/apetência profissional dos professores são considerados, por esta população, menores obstáculos: o obstáculo **C**–“Esta área não se encontra dentro do campo de experiência/conhecimento do professores” encontra-se em 3ª posição e o obstáculo **A**–“A complexidades dos temas associados a estas áreas” em 4ª posição. Em último, surgem factores associados à controvérsia desta área (**D** – “Pode ser muito controverso, devido a factores éticos e morais”).

A amostra 2 apresenta um perfil de resposta diferente (figura IV-8), não se observando uma divisão clara entre as questões logísticas e aquelas que se relacionam com a formação e apetência profissional dos professores como é observado na Amostra 1. Para a Amostra 2 o facto desta área não se encontrar dentro do campo de experiência/conhecimento do professor (**C**) é considerado o maior obstáculo (30,8%), seguido da implementação demasiado dispendiosa (**B**, 2ª posição), a complexidade dos temas (**A**, 3ª posição), a falta de material/equipamentos nas salas de aula (**E**, 4ª posição) e por fim, tal como na Amostra 1, a controvérsia relacionada com factores éticos e morais (**D**).

3ª Parte – O Trabalho Prático

A terceira parte do questionário tem por objectivo conhecer a opinião dos inquiridos acerca da importância da aplicação do Trabalho Prático no ensino secundário. Para o efeito, as respostas recolhidas são analisadas (salvaguardando, sempre que oportuno, as diferenças entre as duas amostras).

Questão H: Realização de Trabalho Prático nas disciplinas do ensino secundário

A maioria dos inquiridos (91,7%) da população inquirida admite realizar Trabalho Prático com os seus alunos. A percentagem de inquiridos que admite não realizar Trabalho Prático é de 8,3% do total dos inquiridos, sendo esta percentagem superior para a amostra 2 (15,4%) (figura IV-9).

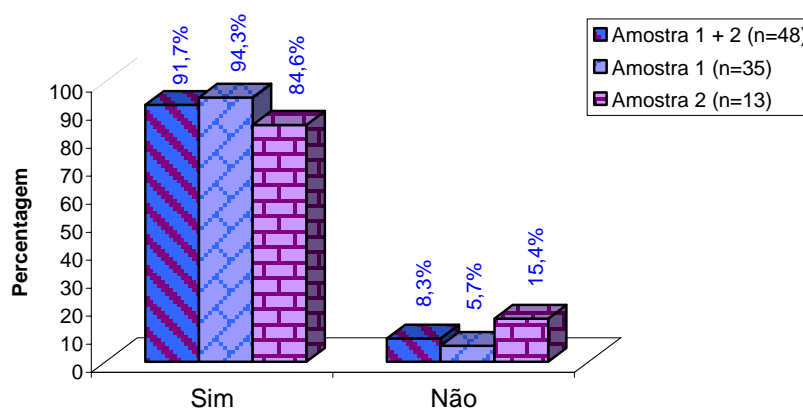


Figura IV - 9: Representação gráfica da distribuição (%) dos inquiridos em função da realização de Trabalho Prático com os seus alunos

Analisando os dados (anexo V), podemos observar uma heterogeneidade nas características dos dois professores inquiridos da Amostra 1 (quer na idade quer no tempo de serviço) que admitem não realizar Trabalho Prático, não se podendo, assim, tirar correlações/ilacões sobre as razões pelas quais não realizam Trabalho Prático.

Na Amostra 2, 15,4% dos inquiridos admitem não realizar Trabalho Prático. Recorrendo novamente a uma análise individual dos resultados (anexo V), observa-se que alguns destes inquiridos consideram como uma das principais causas da ineficácia do Trabalho Prático a falta de recursos económicos e materiais nas escolas (questão J10), o que poderá, pelo menos em parte, justificar estas respostas.

Questão I: Frequência média da realização de Trabalho Prático pelos professores inquiridos

A esta questão responderam apenas os inquiridos que na questão anterior assumiram realizar Trabalho Prático (91,7% no total da população). Face a esta questão é notório que a maioria destes professores realiza Trabalho Prático três ou mais vezes por período (43,8%), enquanto que 31,3% realiza Trabalho Prático duas

vezes por período (figura IV-10). O perfil de resultados é muito semelhante para ambas as amostras, salientando-se somente o facto de 15,4% da Amostra 2 referir realizar Trabalho Prático somente uma vez por período.

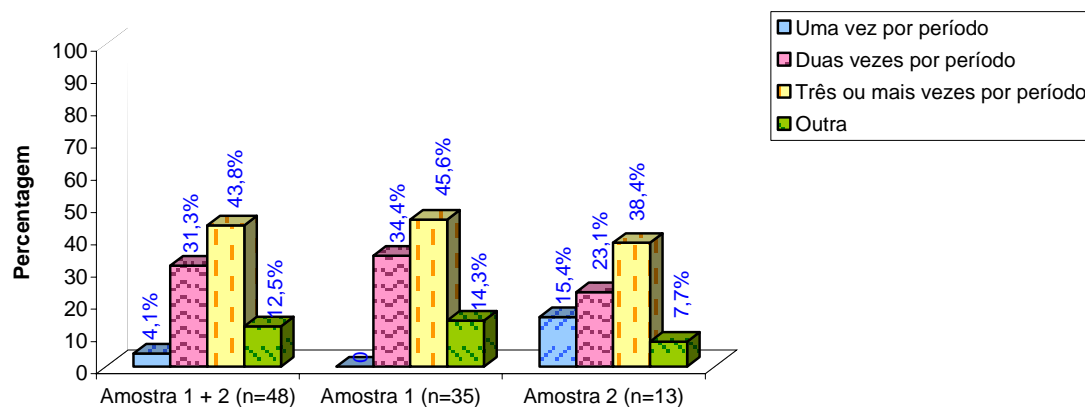


Figura IV - 10: Representação gráfica da frequência média da realização de Trabalho Prático por parte dos inquiridos que responderam realizar Trabalho Prático. A categoria “Outra” refere-se à resposta “Sempre que possível” dada pelos inquiridos.

Questão J: O Trabalho Prático

À semelhança da questão F utilizou-se nesta questão a escala de “Likert”, a qual como já foi referido permite comparar e valorizar as respostas dadas em cada um dos itens de resposta (figura IV-11 a IV-18).

Questão J1: O uso de ferramentas didáticas motivadoras alarga a capacidade dos alunos, ajudando-os a utilizar o conhecimento em situações reais.

Observando o gráfico da figura IV-11, verifica-se que 60,4% do total dos inquiridos “concorda totalmente” com a afirmação, sendo o somatório de “concordo totalmente” e “concordo” de 95,8%. Não havendo inquiridos que discordam, há contudo uma baixa percentagem de inquiridos (4,2% do total dos inquiridos) que não exprime opinião.

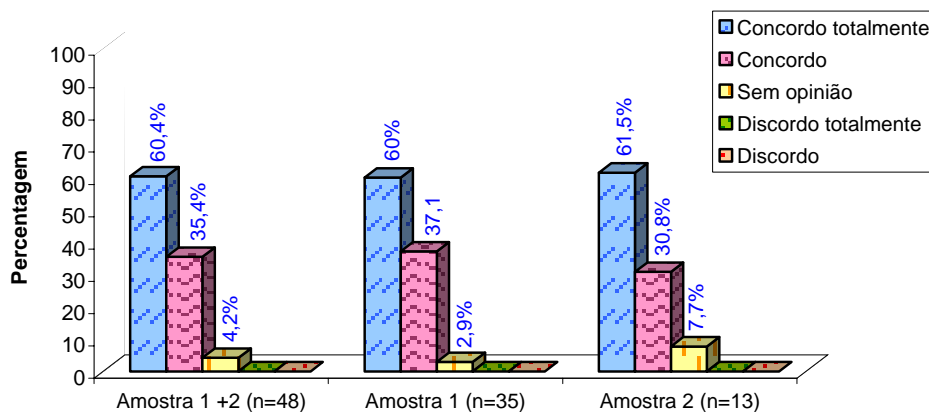


Figura IV - 11: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente à afirmação J1: O uso de ferramentas didáticas motivadoras alarga a capacidade dos alunos ajudando-os a utilizar o conhecimento em situações reais

Questão J2: A eficácia e utilidade do Trabalho Prático dependem do modo como é usado.

No que se refere à afirmação “A eficácia e utilidade do Trabalho Prático dependem do modo como é usado”, é evidente a homogeneidade das opiniões (figura IV -12). O somatório das categorias de resposta “concorde totalmente” e “concorde” atinge os 100%, não se verificando grande discrepância na distribuição entre as duas categorias.

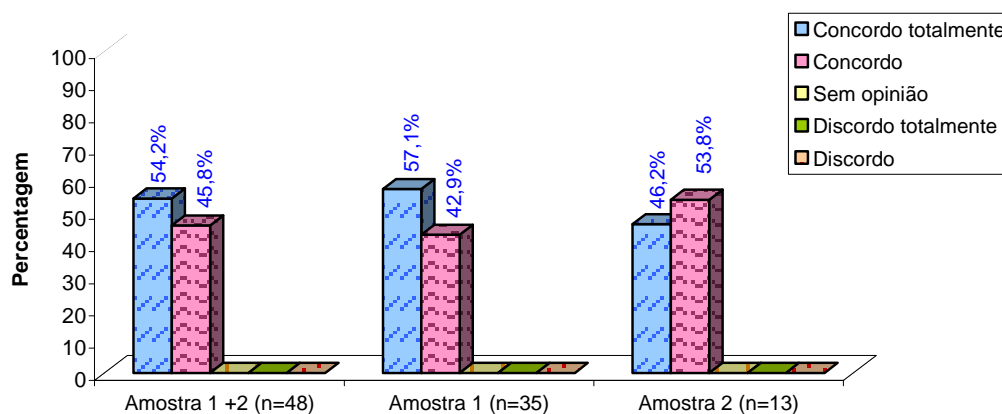


Figura IV - 12: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente à afirmação J2: A eficácia e utilidade do Trabalho Prático dependem do modo como é usado

Questão J3: O uso do Trabalho Prático na sala de aula motiva o aluno na abordagem dos conteúdos programáticos.

No que se refere à concordância dos inquiridos com a afirmação “O uso do Trabalho Prático na sala de aula motiva o aluno na abordagem dos conteúdos programáticos” (figura IV – 13), verifica-se que o somatório

das duas categorias de resposta, “concordo totalmente” e “concordo” é, no total dos professores inquiridos, 97,9%. Na Amostra 1 predomina a categoria “concordo totalmente”, enquanto na Amostra 2 os inquiridos encontram-se distribuídos de forma mais equilibrada pelas duas categorias “concordo totalmente” e “concordo”. Mais uma vez, surge, na amostra 1, um professor que discorda da afirmação.

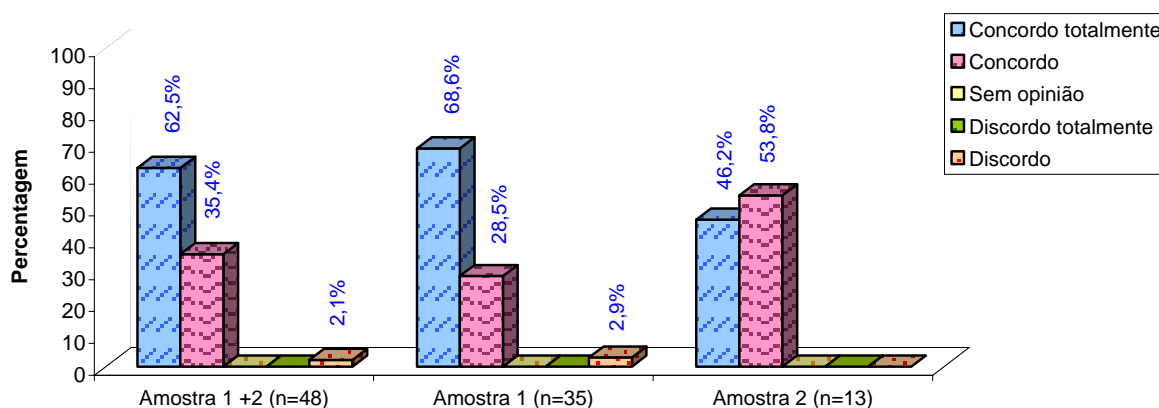


Figura IV - 13: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente à afirmação J3: O uso do Trabalho Prático na sala de aula motiva o aluno na abordagem dos conteúdos programáticos

Questões J4, J5, J6: Influência do Trabalho Prático no domínio cognitivo

Face a estas questões, relacionadas com a influência no domínio cognitivo do Trabalho Prático, verifica-se que mais de 50% do total dos inquiridos “concorda totalmente” com as três afirmações. No entanto, salienta-se que para a Amostra 2 existe uma valorização (no contexto defendido por Carmo e Ferreira 1998) das questões J5 (“A nível cognitivo o Trabalho Prático permite desenvolver no aluno a capacidade de análise, interpretação e discussão de resultados”) e J6 (“O Trabalho Prático permite a discussão de ideias, a reflexão e a avaliação crítica de todo o trabalho desenvolvido”) em relação à questão J4 (“A nível cognitivo o Trabalho Prático permite ilustrar conceitos, factos e princípios de uma forma mais clara”), para a qual a percentagem de inquiridos que “concorda” com a afirmação (69,2%) é muito superior à percentagem de inquiridos que “concorda totalmente” (23,1%).

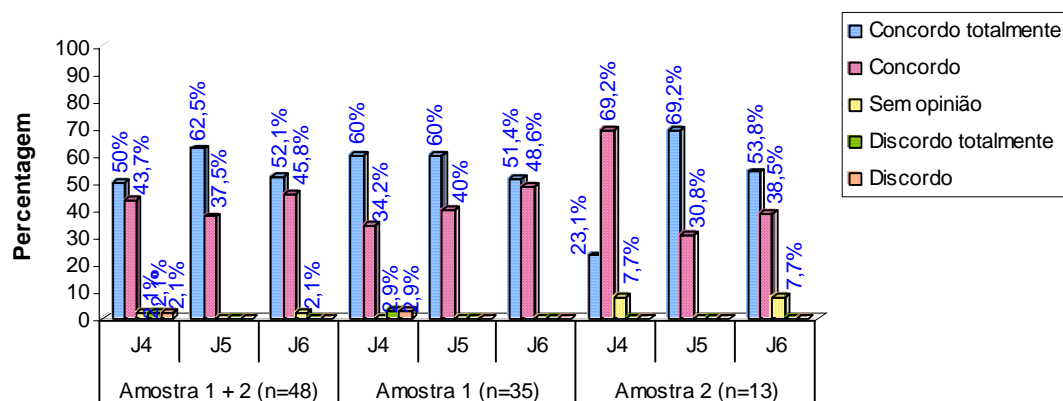


Figura IV - 14: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente às afirmações – J4: A nível cognitivo o Trabalho Prático permite ilustrar conceitos, factos e princípios de uma forma mais clara; J5: A nível cognitivo o Trabalho Prático permite desenvolver no aluno a capacidade de análise, interpretação e discussão de resultados e J6: O Trabalho Prático permite a discussão de ideias, a reflexão e a avaliação crítica de todo o trabalho desenvolvido

Resta salientar a existência de uma baixa percentagem de inquiridos que não exprimem opinião quanto às questões J4 e J6, e que “discordam”/“discordam totalmente” da questão J4.

Questão J7: “O Trabalho Prático é uma mais valia para o professor” e Questão J8: “O Trabalho Prático ajuda o professor no processo de ensino-aprendizagem tornando mais reais os fenómenos biológicos para os alunos”

Relativamente à questão J7 (“O Trabalho Prático é uma mais valia para o professor”), a esmagadora maioria dos professores inquiridos (91,7%) inclui-se nas categorias “concordo” e “concordo totalmente” (figura IV-15). Predomina, no entanto, a categoria “concordo” (51,4% na Amostra 1 e 53,8% na Amostra 2), havendo ainda alguns professores que manifestaram não ter opinião (8,3% do total dos inquiridos).

No que se refere à questão J8 (“O Trabalho Prático ajuda o professor no processo de ensino-aprendizagem tornando mais reais os fenómenos biológicos para os alunos”), mais uma vez o somatório dos professores inquiridos que concordam e concordam totalmente com a afirmação é superior a 90% (figura IV-15). Contrariamente à questão anterior, onde predominava a categoria de resposta “concordo”, aqui predomina a categoria “concordo totalmente”.

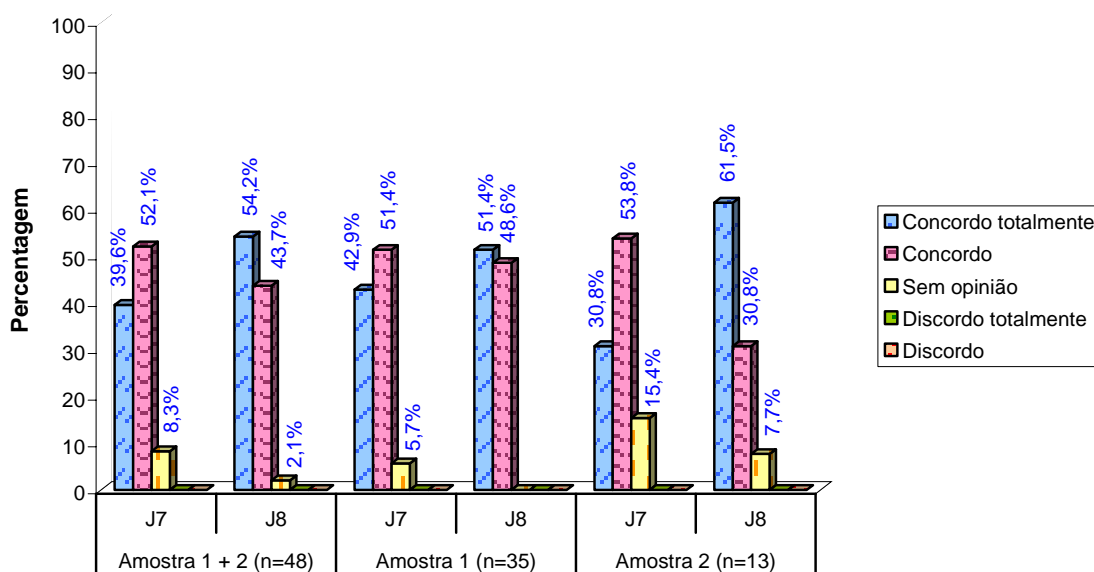


Figura IV - 15: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente às afirmações – J7: O Trabalho Prático é uma mais valia para o professor e J8: O Trabalho Prático ajuda o professor no processo de ensino-aprendizagem tornando mais reais os fenómenos biológicos para os alunos.

Resta salientar que para a Amostra 2 existe uma valorização da questão J8 em relação à questão J7, para a qual a percentagem de inquiridos que “concorda” com a afirmação (53,8%) é superior à percentagem de inquiridos que “concorda totalmente” (30,8%). De notar que a questão J8 é mais específica que a anterior o que pode justificar, pelo menos em parte, os resultados obtidos.

Questão J9: O Trabalho Prático favorece o desenvolvimento de autoconfiança, empenho, determinação e responsabilidade no aluno

Relativamente à questão J9 (“O Trabalho Prático favorece o desenvolvimento de autoconfiança, empenho, determinação e responsabilidade do aluno”) existe, mais uma vez, uma concordância generalizada por parte dos professores inquiridos, que ultrapassa os 90% (somando as categorias “concordo totalmente” e “concordo”). Na Amostra 1, verifica-se uma distribuição relativamente homogênea entre as duas categorias, embora com ligeira predominância da categoria “concordo totalmente” (54,3%), enquanto que na Amostra 2 a maioria dos inquiridos se integra na categoria “concordo”, havendo ainda um pequeno grupo “sem opinião”.

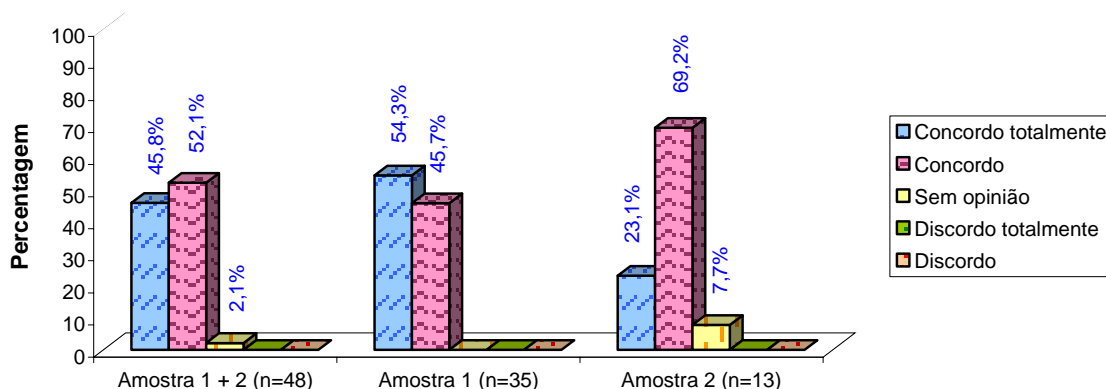


Figura IV - 16: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente à afirmação – J9: O Trabalho Prático favorece o desenvolvimento de autoconfiança, empenho, determinação e responsabilidade no aluno

Quando confrontados os resultados das questões J4, J5 e J6 relativas à influência do Trabalho Prático a nível cognitivo e a questão J9 relativa à influência do Trabalho Prático a nível atitudinal não se verifica valorização de nenhum dos níveis, sendo no primeiro caso a percentagem da categoria de resposta “concordo totalmente”, em média, superior a 50% e no segundo caso de 45,8%.

Questão J10: A falta de recursos económicos e materiais nas escolas é a principal causa de ineficácia do Trabalho Prático e Questão J11: As dificuldades na implementação do Trabalho Prático passam pela relação tempo/extensão dos programas

A questão J10 (“A falta de recursos económicos e materiais nas escolas é a principal causa de ineficácia do Trabalho Prático”) foi das que apresentou maior heterogeneidade na distribuição por categorias de resposta. Contudo a predominante é a categoria “concordo” (47,9% do total dos inquiridos). Somando esta categoria com a de “concordo totalmente”, verifica-se que 67,9% dos inquiridos exprime concordância com esta afirmação. Saliente-se que a percentagem dos inquiridos que “discorda”/“discorda totalmente” foi de 29,2% no total da população, tendo tido, contudo maior expressão na Amostra 2 (38,5%) do que na Amostra 1 (25,7%).

No que diz respeito à questão J11, embora também seja evidente um padrão heterogéneo de respostas, torna-se evidente que a grande maioria dos professores inquiridos (87,6%) “concorda” ou “concorda totalmente” que as dificuldades na implementação do Trabalho Prático passam pela relação tempo/extensão dos programas, e apenas 10,4% “discorda”/“discorda totalmente” com a afirmação. Contudo, analisando as amostras individualmente, o perfil é diferente, com a Amostra 1 a apresentar 91,4% dos inquiridos que “concorda”/“concorda totalmente”, valor que desce para 76,9% na Amostra 2. É ainda nesta amostra que se verifica a maior percentagem de inquiridos que discordam da afirmação (23,1%).

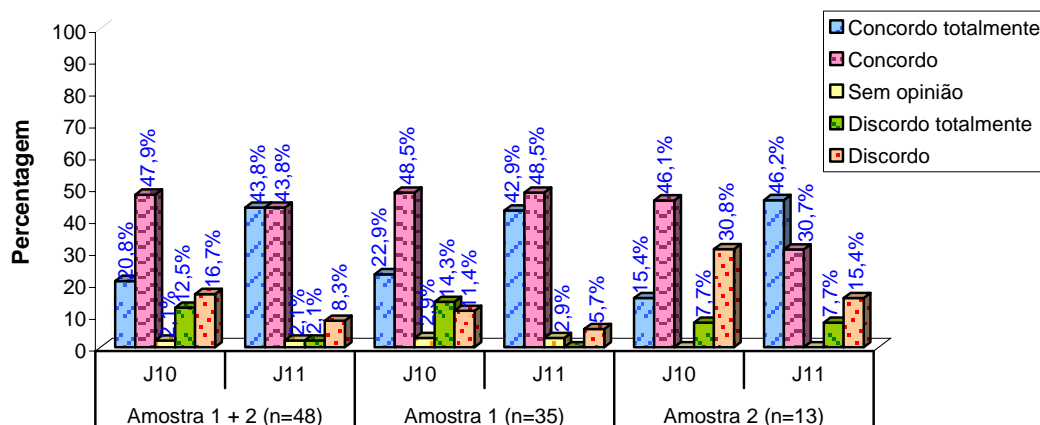


Figura IV - 17: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente às afirmações – J10: A falta de recursos económicos e materiais nas escolas é a principal causa de ineficácia do Trabalho Prático e J11: As dificuldades na implementação do Trabalho Prático passam pela relação tempo/extensão dos programas

Questão J12: A falta de procedimentos experimentais simples e adaptados à realidade das escolas na área da Biotecnologia dificulta a sua implementação na sala de aula.

Observando o gráfico da figura IV-18 verifica-se que 94,2% dos inquiridos da amostra 1 “concorda” ou “concorda totalmente” com a afirmação, sendo que na Amostra 2 esse total é de 92,3%. Torna-se desta forma evidente a necessidade de otimizar procedimentos experimentais na área da Biotecnologia, integrados o mais possível na realidade de cada escola.

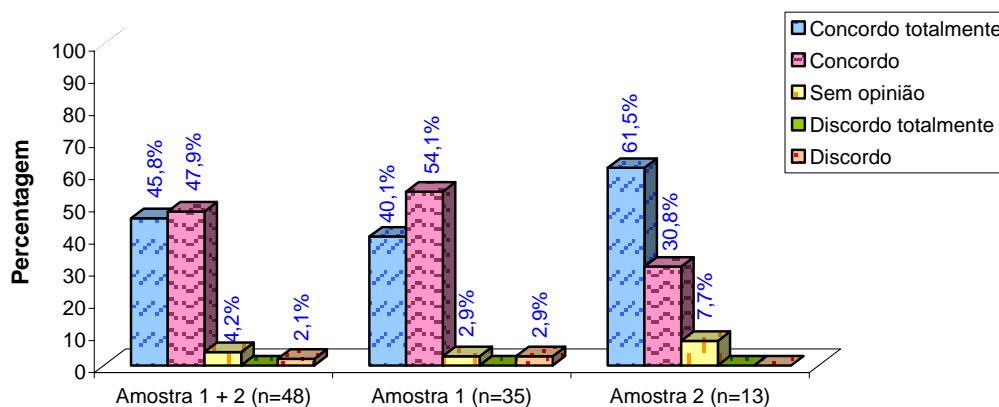


Figura IV - 18: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente à afirmação – J12: A falta de procedimentos experimentais simples e adaptados à realidade das escolas na área da Biotecnologia dificulta a sua implementação na sala de aula

Quanto às restantes categorias de resposta, um inquirido da Amostra 1 e outro da Amostra 2 responderam “sem opinião”. Saliente-se que ambos não se encontram em 2005/2006 a leccionar Biologia-12ºano..

Questão K: Tipos de aulas laboratoriais mais adequados à sala de aula

A figura IV-19 reporta as respostas dos inquiridos à questão “quais os tipos de aulas laboratoriais considerados mais adequados à sala de aula”, tendo sido permitido aos inquiridos assinalar no máximo 3 opções dentro das apresentadas. Verifica-se que existem dois tipos de trabalho laboratorial que os professores inquiridos consideram mais adequados, e que são o “Trabalho de grupo em que os alunos planeiam e realizam experiências para dar respostas a problemas previamente formulados” com 85,4% do total dos inquiridos e o “Trabalho de grupo com procedimento experimental definido” com 68,7% do total dos inquiridos. Segue-se, em 3º lugar, o “Trabalho de grupo com instruções do professor” o qual é apresentado por 41,7% do total dos inquiridos; e em 4º lugar o “Trabalho individual, com procedimento experimental predefinido”, com 33,3% do total dos inquiridos.

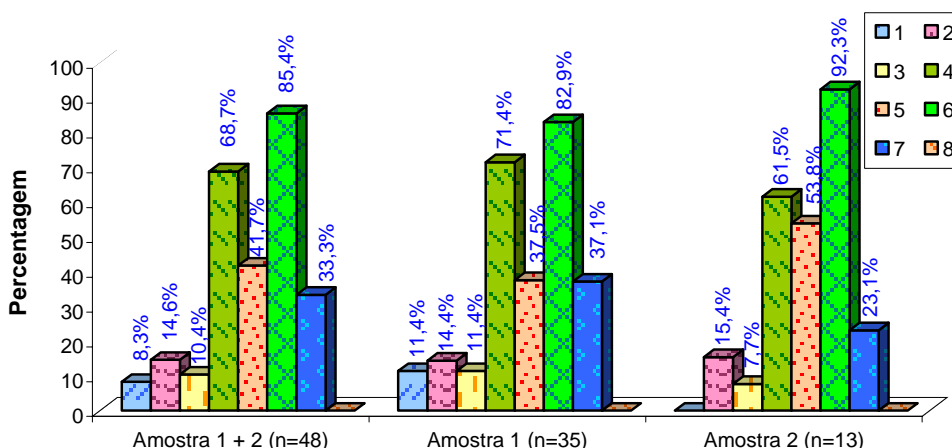


Figura IV -19: Distribuição do grau de concordância dos inquiridos relativamente aos tipos de aulas laboratoriais considerados mais adequados à sala de aula. 1- Demonstração à turma por um aluno, tendo o professor um papel de orientador; 2- Demonstração à turma por um grupo de alunos, tendo o professor um papel de orientador; 3- Demonstração à turma pelo professor; 4- Trabalho de grupo com procedimento experimental definido; 5- Trabalho de grupo com instruções do professor; 6- Trabalho de grupo em que os alunos planeiam e realizam experiências para dar respostas a problemas previamente formulados; 7- Trabalho individual, com procedimento experimental predefinido e 8- Outros.

Os resultados obtidos em cada uma das amostras são muito semelhantes, salientando-se somente o facto de 11,4% da Amostra 1 considerar adequar-se à sala de aula “a demonstração à turma por um aluno, tendo o professor um papel orientador”, enquanto que nenhum inquirido da Amostra 2 o considera.

Os tipos de aula laboratorial menos elegidos são a “demonstração à turma por um grupo de alunos, tendo o professor um papel de orientador”, “demonstração à turma pelo professor” e a “demonstração à turma por um aluno, tendo o professor um papel de orientador”.

Em suma, verifica-se que se privilegiam os tipos de aulas laboratoriais centradas nos alunos, desvalorizando as aulas de demonstração.

Questão L: Possibilidade de execução do tipo de aula laboratorial na escola onde cada professor inquirido lecciona actualmente.

Pela análise do gráfico da figura IV-20, verifica-se que 41,7% do total dos inquiridos considera ser possível a execução dos tipos de aula laboratorial escolhidos na questão anterior, na escola onde cada professor lecciona. Contudo esta percentagem é muito diferente quando analisadas as duas amostras individualmente, sendo que, 51,5% da Amostra 1 considera ser possível enquanto que somente 15,4% da Amostra 2 o consideram. A maior percentagem da Amostra 2 (46,2%) consideram possível a execução do tipo de aula laboratorial escolhido na escola onde leccionam, mas em intercâmbio com as Universidades e outros Centros de Investigação com as Escolas.

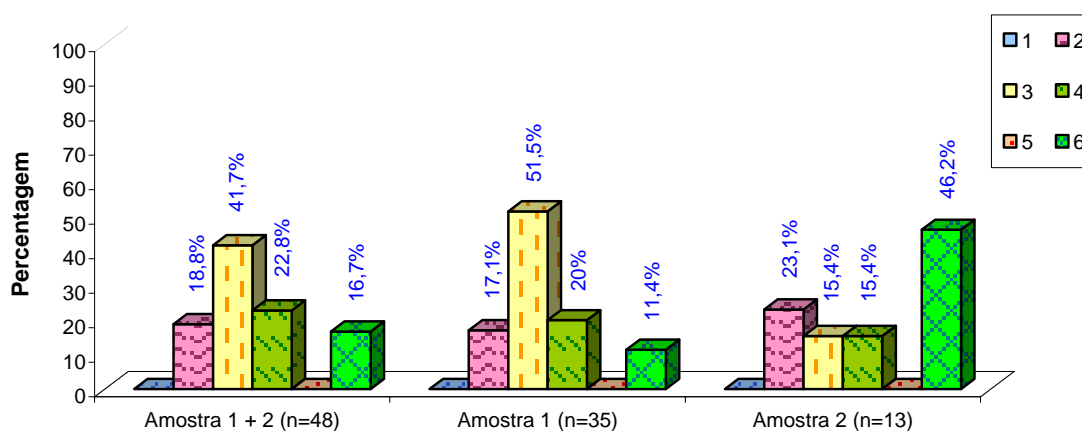


Figura IV - 20: Representação gráfica da posição dos inquiridos face à possibilidade de execução dos tipos de aula laboratorial na escola onde cada inquirido lecciona actualmente. 1- Não é possível; 2- É raramente possível; 3- É possível; 4- É bastante possível; 5- É sempre possível; 6- É possível mas requer um intercâmbio das Universidades e outros Centros de Investigação com as Escolas.

Uma análise da tabela de dados (Anexo V) mostra que os inquiridos que respondem que é possível a execução na escola (de aulas laboratoriais), são os mesmos que elegeram (na questão K) as aulas laboratoriais, como o tipo de aulas mais adaptado para a sala de aula (e.g. “Trabalho de grupo em que os alunos planeiam e realizam experiências para dar respostas a problemas previamente formulados” e “Trabalho de grupo com procedimento experimental definido”).

Questão M: Lista de material/equipamento laboratorial das escolas inquirida.

Na figura IV-21 está agrupada a lista de materiais e equipamentos de laboratório que existem em cada uma das escolas onde os inquiridos leccionam.

A lista de material teve em conta o material necessário para a posterior realização e optimização dos procedimentos experimentais (apresentados no capítulo V).

Pode-se verificar que, de um modo geral, as escolas se encontram relativamente bem equipadas no que se refere ao material/equipamento listado, sendo a escola mais equipada a escola secundária de Estarreja com 32 dos 34 materiais/equipamentos listados. Existem, também, alguns materiais que só uma das escolas os possui, como é o caso das micropipetas, pontas de micropipetas, microtubos (que só existem na escola secundária de Estarreja), câmara de UV (que só existe na escola secundária de Rio Maior) e da tina de electroforese (que só existe na escola secundária com 3º ciclo Condes Resende de Vila Nova de Gaia).

Ao longo da optimização dos procedimentos experimentais, apresentada no capítulo que se segue, foi tido em conta o material que está disponível nas escolas. Para o material menos frequente nas escolas foram dadas sugestões alternativas (e.g. construção de uma câmara de UV).

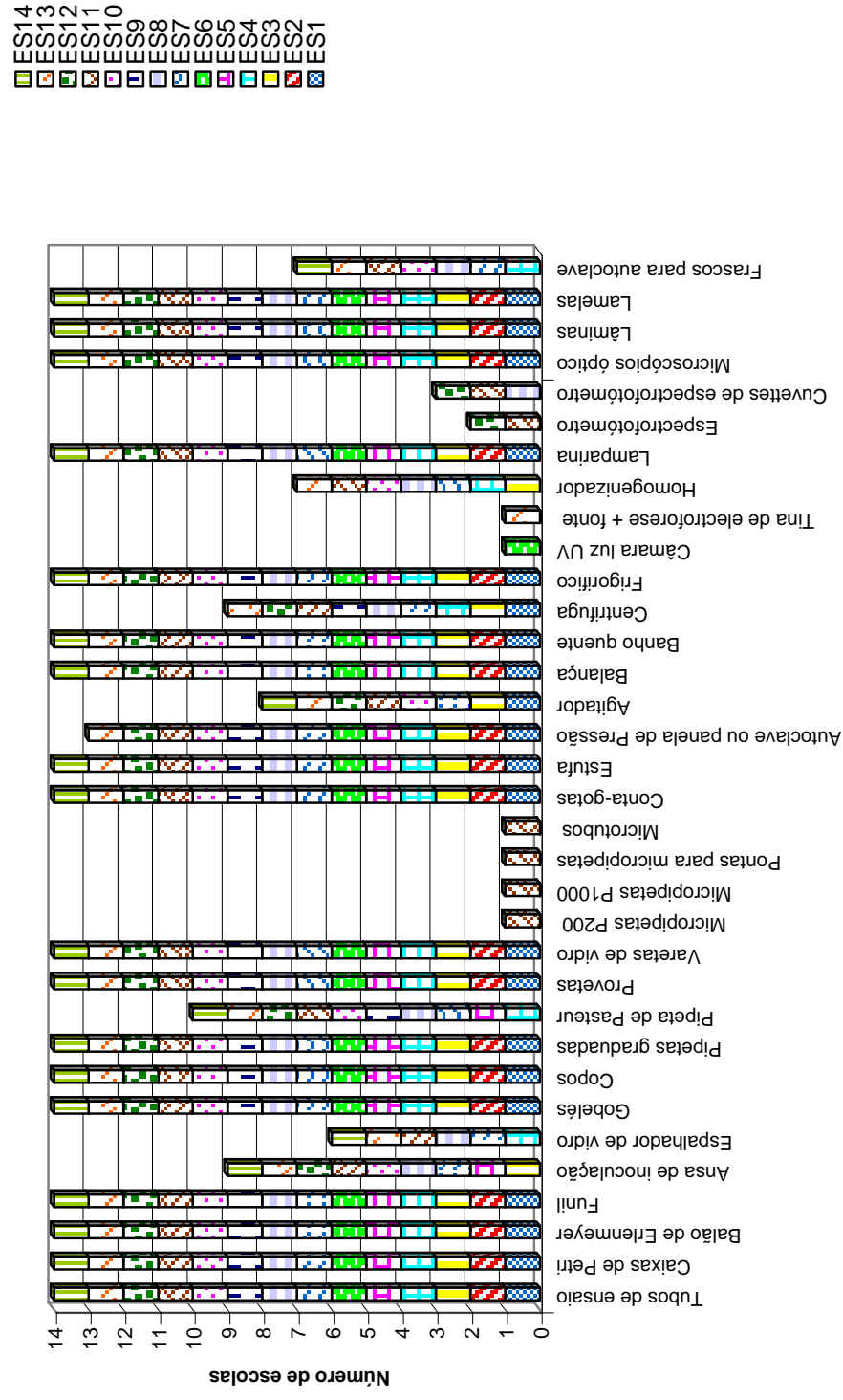


Figura IV - 21: Representação gráfica do número de escolas que possuem o material de laboratório listado. ES1- Escola Secundária com 3º Ciclo da Sé, Guarda; ES2- Escola Secundária com 3º Ciclo Afonso Albuquerque, Guarda; ES3- Escola Secundária com 3º Ciclo de Pinhel; ES4- Escola Secundária Homem de Cristo, Guarda; ES5- Escola Secundária Com 3º Ciclo da Gafanha da Nazaré; ES6- Escola Secundária de Rio Maior; ES7- Escola Secundária Soares Basto, Oliveira de Azeméis; ES8- Escola Secundária com 3º Ciclo de Albergaria-a-Velha; ES9- Escola Secundária com 3º Ciclo Maria Cândida, Mira; ES10- Escola Secundária com 3º Ciclo Conde Resende, Vila Nova de Gaia; ES11- Escola Secundária de Estarreja; ES12- Escola Secundária Dr. José Carlos Celestino Gomes, Ílhavo; ES13- Escola Secundária José Estêvão, Aveiro; ES14- Escola Secundária de Oliveira do Bairro.

Questão N: Considera que o número de alunos por turma condiciona a implementação do Trabalho Prático?

Observando a figura IV-22, verifica-se que a grande maioria do total dos inquiridos (81,2%) considera que o número de alunos por turma condiciona a implementação de Trabalho Prático.

É interessante verificar que, numa análise individual de cada amostra, a Amostra 2 não é tão consensual quanto ao facto do número de alunos por turma condicionar a implementação do Trabalho Prático, sendo que 61,5% consideram que sim (o número de alunos por turma condiciona a implementação do Trabalho Prático) e 38,5% consideram que não.

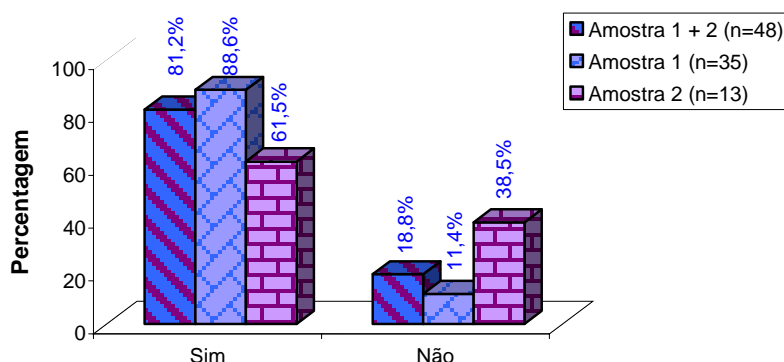


Figura IV - 22: Representação gráfica da percentagem de inquiridos das amostras 1 e 2 que consideram ou não que o número de alunos por turma condiciona a implementação de Trabalho Prático.

Questão O: Qual o número médio de alunos para uma implementação do Trabalho Prático com sucesso?

Na figura IV-23 são apresentados os resultados da totalidade dos inquiridos quanto à sua opinião acerca do número médio de alunos necessários para uma implementação do Trabalho Prático com sucesso. Enquanto 14 inquiridos consideram que esse número deverá ser de 12 alunos, 18 inquiridos consideram que esse número deverá ser de 18 alunos.

Actualmente o número médio de alunos nas turmas de 12º ano do ensino público é de cerca de 25 alunos.

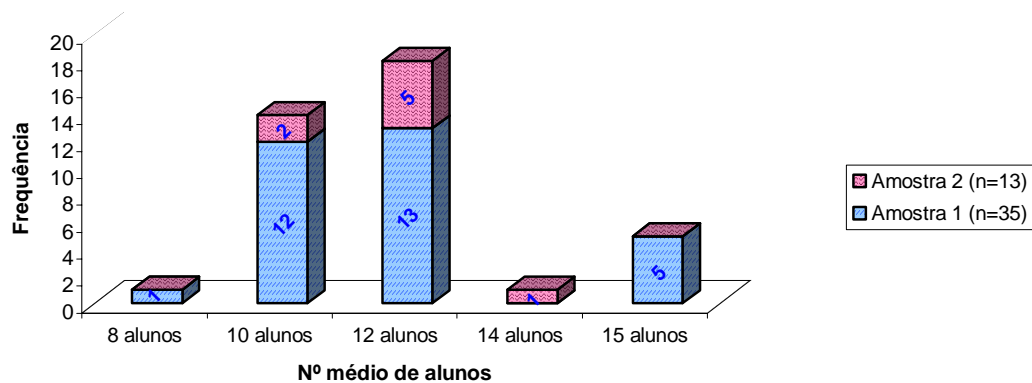


Figura IV - 23: Representação gráfica da frequência de escolha do número médio de alunos pelos inquiridos das amostras 1 e 2.

Questão P: O tempo lectivo por aula, actualmente (90 min), condiciona a implementação do Trabalho Prático

No gráfico da figura IV-24, torna-se evidente que as amostras possuem opiniões diferentes quanto ao facto do tempo lectivo por aula possa ser condicionante da implementação de Trabalho Prático. A maioria dos inquiridos (77,1%) da Amostra 1 consideram que os 90 minutos actuais não condicionam a implementação do Trabalho Prático enquanto que as opiniões dos inquiridos da Amostra 2 se dividem com 53,8% que consideram que sim e 46,2% que consideram que não.

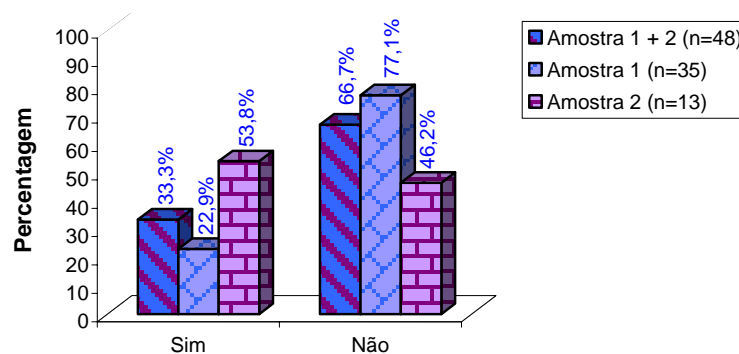


Figura IV - 24: Representação gráfica da percentagem de inquiridos das amostras 1 e 2 que consideram ou não que o tempo lectivo por aula actualmente (90 min) condiciona a implementação de Trabalho Prático

Capítulo V

Actividades laboratoriais

1. Introdução

Neste capítulo são apresentados os materiais, métodos e resultados das experiências laboratoriais efectuadas que deram origem à proposta de procedimentos experimentais de apoio às aulas de Biologia do 12º ano de escolaridade (Guia do professor – Anexo VI).

As actividades laboratoriais foram realizadas no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, utilizando materiais e equipamentos aí disponíveis. Os procedimentos a adoptar foram, posteriormente, reajustados, tendo em conta a disponibilidade de material, equipamento e tempo lectivo nas escolas do ensino público português.

Numa primeira parte deste capítulo será feito o enquadramento programático de cada actividade seleccionada, ao qual se segue toda a descrição dos procedimentos experimentais iniciais e dos aspectos considerados importantes para a optimização dos mesmos, face à realidade das escolas. É também apresentado um orçamento dos materiais e equipamentos utilizados.

Os procedimentos experimentais seleccionados e adaptados neste estudo foram os seguintes:

- Detecção da produção de antibióticos por microrganismos do solo;
- Detecção da produção de enzimas extracelulares por microrganismos do solo;
- Determinação do efeito mutagénico da luz ultravioleta na produção de metabolitos por microrganismos do solo;
 - Detecção de mecanismos de reparação – fotorreactivação;
- Produção em pequena escala de metabolitos microbianos num biorreactor;
- Detecção da presença de enzimas em detergentes domésticos.

As actividades experimentais apresentadas pretendem simular um processo biotecnológico microbiano de produção de um metabolito com interesse industrial, desde a fase de selecção do microrganismo produtor de determinado metabolito, passando pelo melhoramento da produção até à produção do metabolito seleccionado. Estas experiências poderão ser, realizadas, por exemplo, numa turma em grupos de trabalho tendo como objectivo obter um dos metabolitos, e desta forma toda a turma seguirá o processo embora com a obtenção de metabolitos diferentes (antibióticos ou enzimas) (figura V-1). Contudo, cada uma das experiências poderá ser realizada individualmente com o objectivo de abordar determinado conteúdo programático. Por exemplo, a experiência “Determinação do efeito mutagénico da luz UV na produção de metabolitos por microrganismos do solo” por si só permite abordar conteúdos, tais como, a expressão genética, as mutações e os mecanismos de reparação do ADN.

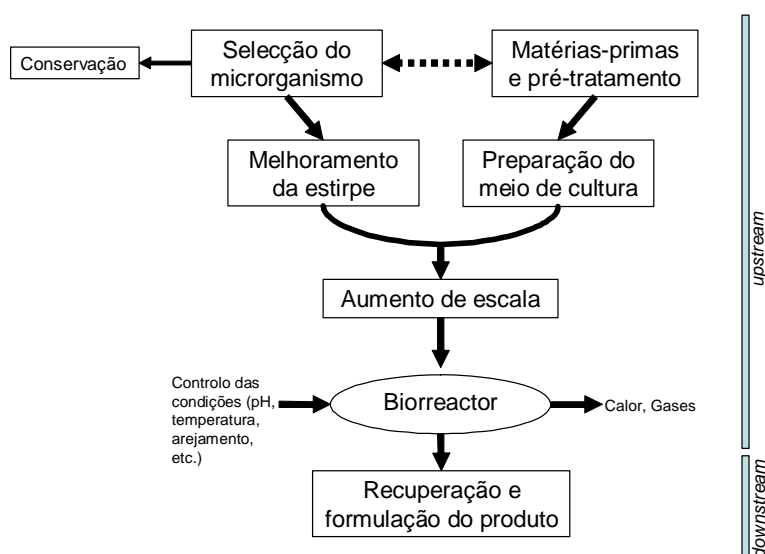


Figura V-1: Esquema simplificado de um processo industrial de Biotecnologia Microbiana (adaptado de Lima *et al*, 2003 and Waites *et al*, 2001)

O processo de execução laboratorial, análise dos resultados e de todos os aspectos de adequabilidade inerentes à implementação dos procedimentos experimentais na sala de aula (essencialmente custo, tempo e complexidade do procedimento) foi seguido da elaboração do procedimento otimizado, a partir do qual, foi construído o *guia do professor*. Este pretende familiarizar o professor quanto aos objectivos e finalidades da actividade, onde é descrito todo o procedimento da actividade, o trabalho prévio do professor, tempo de execução e possível integração nos Programas Nacionais de Biologia do 12º ano. Desta forma, o *guia do professor* é uma proposta de material didáctico que tem como principal objectivo auxiliar o professor na planificação de uma aula de Biologia do 12º ano, servindo de material de base ou complemento da mesma (Anexo VI).

2. Enquadramento das actividades no Programa Nacional de Biologia do 12º ano

Cada cidadão deve estar preparado para enfrentar com confiança as questões científico-tecnológicas que a sociedade lhes coloca, sendo capaz de ponderar argumentos, formular opiniões e participar na tomada de decisões. Este é um dos objectivos da Biologia do 12º ano, tal como é referido no Programa Nacional desta disciplina, o qual pretende contribuir para a formação científica dos alunos. É, neste sentido, necessário desenvolver dinâmicas de aprendizagem diversificadas e centradas nos alunos.

O material de apoio que aqui se apresenta integra-se no programa da disciplina de Biologia do 12º ano, mais especificamente, nos tópicos programáticos – Regulação do material genético; Mutações; Biotecnologia no diagnóstico e terapêutica de doenças; Microrganismos e a indústria. O conjunto de todos os procedimentos experimentais, tal como já foi referido, pretendem simular um processo industrial de Biotecnologia Microbiana.

Tendo em conta os procedimentos experimentais otimizados e os conteúdos programáticos da disciplina de Biologia do 12º ano (Mendes *et al*, 2004) torna-se claramente evidente a adequabilidade da escolha destes procedimentos, sendo possível abordar com os alunos grande parte dos conteúdos programáticos e desenvolver as competências inerentes a estes.

Tabela V - 1: Enquadramento dos procedimentos experimentais nos conteúdos conceptuais do programa nacional de Biologia 12ºano.

Procedimentos experimentais	Conteúdos Conceptuais
Detecção da produção de antibióticos por microrganismos do solo	- Biotecnologia no diagnóstico e terapêutica de doenças - Microrganismos e a indústria
Detecção da produção de enzimas extracelulares por microrganismos do solo	- Microrganismos e a indústria - Actividade enzimática
O efeito mutagénico da luz UV na produção de metabolitos por microrganismos do solo	- Regulação do material genético - Alteração do material genético - Biotecnologia no diagnóstico e terapêutica de doenças - Microrganismos e a indústria
Produção de metabolitos microbianos num biorreactor	- Biotecnologia no diagnóstico e terapêutica de doenças - Microrganismos e a indústria - Actividade enzimática
Detecção da presença de enzimas em detergentes domésticos	- Microrganismos e a indústria - Actividade enzimática

A utilização dos materiais didácticos construídos, no contexto sala de aula, pretendem, além de enriquecer o conhecimento científico dos alunos relacionado com os conteúdos programáticos, promover:

- A discussão de problemas relacionados com a temática da Biotecnologia, com incidências sociais;
- O desenvolvimento de competências, tais como, problematizar, pesquisar, formular hipóteses, interpretar e analisar dados, argumentar, avaliar e validar ideias;
- O desenvolvimento de atitudes e códigos de conduta que permitam a adopção de posições em relação às utilizações sociais da Ciência e da Tecnologia;

3. Material e métodos

3.1. Detecção da produção de antibióticos por microrganismos do solo

O processo de obtenção de um antibiótico produzido por microrganismos inicia-se com a selecção de microrganismos produtores recorrendo a um determinado ambiente. Desta forma, vários microrganismos são estudados, sendo recolhidos do seu ambiente natural e submetidos a uma selecção e isolamento, para que na fase final se obtenha uma cultura pura de um microrganismo produtor de determinado antibiótico de interesse.

As técnicas usadas para o processo de selecção e isolamento de um microrganismo produtor de antibiótico podem, de uma forma mais tradicional, ser recreadas no laboratório simples de uma escola, sendo possível estudar diversos conteúdos inseridos nos programas nacionais, entre outros, o estudo da Biotecnologia, da diversidade microbiana e da expressão genética.

Na actividade experimental que se segue, a obtenção de microrganismos do solo produtores de antibióticos foi realizada utilizando meios de cultura selectivos e meios de cultura complexos, com o objectivo de escolher o procedimento mais adequado para a sala de aula.

Os meios de cultura selectivos utilizados foram os descritos a partir do procedimento experimental descrito por Barnard (1994).

Parte do trabalho de laboratório inerente a esta actividade, “Detecção da produção de antibióticos por microrganismos do solo”, foi realizado em paralelo com o trabalho desenvolvido pela Professora Ana Gabriel, que se encontra a realizar doutoramento em Biologia na temática da transposição de percursos investigativos em Biotecnologia para o ensino secundário, na Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia.

i) Material/equipamento:

- 5 placas de Petri com meio NA (*Nutrient Agar*)
- 3 placas de Petri com meio de isolamento
- 1 placa de Petri com meio de crescimento
- Lamparina
- Espalhador de vidro
- Ansa de inoculação
- Álcool etílico a 95%
- Palitos de madeira estéreis
- 1 tubo de ensaio estéril com 10 ml de água destilada estéril
- 4 tubos de ensaio estéreis com 9ml de água destilada estéril
- Micropipeta P1000 e pontas estéreis
- Caneta de acetato
- Autoclave
- Balança
- Estufa
- 1g de solo
- Cultura em placa de *Micrococcus luteus*
- 25ml de meio NB (*Nutrient Broth*)
- 50ml de meio NA (*Nutrient Agar*)

ii) Meios de cultura selectivos:

- Meio de isolamento:
 - ✓ 0,4g de caseína
 - ✓ 1g de amido
 - ✓ 0,5g de nitrato de potássio
 - ✓ 0,2g de monohidrogenofosfato de potássio
 - ✓ 0,1g de fosfato de magnésio
 - ✓ 0,1g de carbonato de cálcio
 - ✓ 15g de agar
 - ✓ Água destilada para perfazer um volume de 1L

- Esterilizar a 120°C durante 15 minutos e antes de colocar em placas adicionar 1ml de cicloheximida.

- Meio de crescimento:
 - ✓ 10g de glucose
 - ✓ 1g de estrato de levedura
 - ✓ 1g de nitrato de potássio
 - ✓ 0,1g de monohidrogenofosfato de potássio
 - ✓ 15g de agar
 - ✓ Água destilada para perfazer um volume de 1L

- Esterilizar a 120°C durante 15 minutos e antes de colocar em placas adicionar 1ml de cicloheximida.

A cicloheximida é um antibiótico, utilizado pela sua capacidade de inibir o crescimento de fungos. As células alvo deste antibiótico são as células eucariotas, inibindo a actividade da peptidil-transferase na subunidade 60S do ribossoma, ou seja, interfere na síntese proteica. É um antibiótico produzido por *Streptomyces griseus*. Tem efeitos tóxicos significativos incluindo danos no DNA. É, geralmente, utilizado em culturas *in vitro* devido ao seu efeito fungicida.

A cicloheximida é preparada em álcool a 95% numa proporção de 100mg/ml.

iii) Obtenção da amostra de solo

1. Recolher cerca de 5g de solo a 10 cm da superfície;
2. Armazenar a amostra num recipiente à temperatura ambiente durante uma semana.

O procedimento do ponto 2 funciona como uma primeira fase de selecção dos microrganismos, pois com a secagem do solo alguns microrganismos irão morrer ficando em maior abundância os produtores de esporos entre as quais se encontram os principais produtores de antibióticos – *Streptomyces* e *Bacillus* (Anexo VII).

iv) Isolamento de microrganismos do solo

1. Colocar 1 grama de solo num tubo de ensaio com 10 ml de água destilada (diluição inicial);
2. Agitar vigorosamente e deixar repousar 5 minutos;
3. Proceder a diluições seriadas de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , a partir da diluição inicial;
4. Inocular, por espalhamento, 100µl das diluições efectuadas em placas de Petri contendo o meio de isolamento;
5. Incubar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, simulando as condições naturais no solo, durante 5 a 7 dias.
6. Repetir o procedimento efectuado no ponto 4, em placas de Petri contendo meio NA.
7. Incubar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 2 a 3 dias.

v) Obtenção de isolados microbianos

1. Com um palito de madeira estéril isolar, a partir das placas de Petri contendo meio de isolamento, algumas colónias, obtidas no ensaio anterior, para placas de Petri contendo o meio de crescimento.
2. Incubar 4 dias à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
3. Repetir o procedimento efectuado no ponto 1, partindo das placas Petri com meio NA para novas placas de Petri, com este mesmo meio.
4. Incubar 2 a 3 dias à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Os microrganismos produtores de antibióticos mais comuns no solo apresentam alguns aspectos característicos, tais como: forma arredondada e aspecto pó de giz (Anexo VII); estas características devem ser tidas em conta durante o isolamento de colónias podendo, desta forma, obter-se uma maior abundância de microrganismos produtores de antibióticos e consequentemente melhores resultados.

vi) Detecção da actividade antibiótica

A detecção da actividade antibiótica foi efectuada recorrendo a três técnicas diferentes: por sobrecamada de estirpe indicadora nas placas obtidas no final da fase de isolamento de microrganismos do

solo, por sobrecamada da estirpe indicadora nas placas com os isolados microbianos (procedimento 1); e pela técnica de riscado (procedimento 2).

Procedimento 1 (por sobrecamada):

1. Inocular 25ml de meio NB com uma alíquota da estirpe indicadora (*Micrococcus luteus*);
2. Incubar a estirpe indicadora 36 horas a 37°C;
3. Inocular por incorporação de 0,5ml da cultura da estirpe indicadora, 50ml de meio NA;
4. Verter o meio, formando uma camada sobre as placas com microrganismos do solo obtidos no final da fase de isolamento;
5. Repetir o ponto 4, nas placas de Petri com os isolados microbianos das placas com meio de crescimento e com meio NA.
6. Incubar as placas durante 24h a 37°C.

O resultado é considerado positivo se, em torno das colónias dos microrganismos isolados, aparecer um halo de inibição de crescimento da estirpe indicadora.

Procedimento 2 (técnica de riscado):

1. Com a ansa de inoculação retirar uma colónia das placas de Petri contendo meio NA, obtidas a partir do isolamento de microrganismos do solo, e fazer um traço numa nova placa contendo o mesmo meio.
2. Repetir o mesmo procedimento fazendo 4 traços por placa (figura V- 2).
3. Incubar por 3 dias à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.
4. Retirar uma alíquota da cultura da estirpe indicadora e inocular de seguida nas placas de Petri anteriores segundo o esquema (figura V- 2), de forma a cobrir toda a superfície da placa.
5. Incubar as placas a 37°C durante 36 horas.

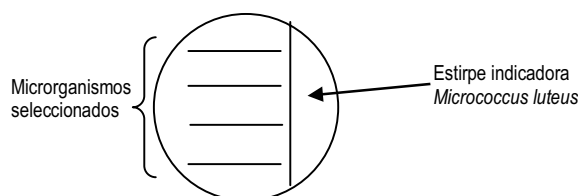


Figura V- 2: Representação esquemática da distribuição dos microrganismos seleccionados e teste para detectar a actividade antimicrobiana.

O resultado é considerado positivo se, se verificar inibição de crescimento da estirpe indicadora junto à extremidade do traço do microrganismo seleccionado.

3.2. Detecção da produção de enzimas extracelulares por microrganismos do solo

Muitos microrganismos produzem enzimas extracelulares, provavelmente em resposta à adaptação a determinado habitat. Entre as enzimas produzidas por microrganismos, podemos salientar as celulasas, as xilanasas, as amilases, as proteases, as peptidases, as lipases e as queratinases.

Várias enzimas extracelulares microbianas, têm aplicação na indústria alimentar, na indústria têxtil, na indústria dos detergentes, entre outras, sendo por isso, importante o seu estudo.

Neste procedimento experimental pretende-se detectar a produção de enzimas extracelulares por microrganismos do solo, realizando um ensaio simples de crescimento de microrganismos em placas de Petri contendo meios específicos. Este ensaio é facilmente exequível numa sala de aula.

Para esta actividade foram escolhidas duas actividades hidrolíticas muito frequentes: a actividade proteolítica (hidrólise das ligações peptídicas das proteínas) e a actividade lipolítica (hidrólise entre as ligações ésteres nos lípidos).

3.2.1. Detecção de microrganismos produtores de proteases e lipases extracelulares

i. Material/equipamento:

- 4 placas de Petri com meio NA (*Nutrient Agar*) + leite magro
- 4 placas de Petri com meio NA +gema de ovo
- Lamparina
- Espalhador de vidro
- Álcool etílico a 95%
- 1 tubo de ensaio estéril com 10 ml de água destilada estéril
- 4 tubos de ensaio estéreis com 9ml de água destilada estéril
- Micropipeta P1000 e pontas estéreis
- Caneta de acetato
- Autoclave
- Balança
- 1 g de solo
- 50 ml de meio NA (*Nutrient Agar*)
- leite magro

ii. Obtenção da amostra de solo

A amostra de solo é recolhida seguindo o mesmo procedimento da experiência anterior (ponto 3.1).

iii. Preparação dos meios de cultura específicos para a detecção da actividade proteolítica e lipolítica

- Para a detecção da **actividade proteolítica**:
 1. Preparar meio NA com leite magro em pó a uma concentração final de 5% e 10%;
 2. Autoclavar ambas as concentrações de meio durante 20 minutos a 120°C, 1atm. e distribuir por placas de Petri.
- Para a detecção da **actividade lipolítica**:
 1. Preparar 200ml de meio NA;
 2. Autoclavar durante 20 minutos a 120°C, 1atm. Aguardar que a temperatura do meio baixe até cerca dos 50°C;
 3. Durante o tempo de espera, esterilizar a superfície do ovo num copo com álcool étilico a 95%, durante 5 minutos;
 4. Adicionar a gema do ovo ao meio de cultura misturar e distribuir por placas de Petri.

iv. Inoculação da amostra de solo

As diluições da amostra de solo são executadas da mesma forma que se apresenta na experiência anterior. Uma alíquota de cada diluição é inoculada em triplicado, para a detecção de cada uma das actividades: proteolítica em placas de Petri com meio NA contendo leite a 10% e a 5% e lipolítica em placas de Petri com meio NA contendo gema de ovo. O tempo de incubação é de 36 horas à temperatura ambiente.

Para ambos os testes o resultado é considerado positivo se, se verificar um halo transparente em redor da colónia do microrganismo produtor de proteases ou lipases extracelulares, dependendo do meio de cultura.

3.3. Determinação do efeito mutagénico da luz ultravioleta na produção de metabolitos por microrganismos do solo;

Num processo de biotecnologia microbiana é comum recorrer-se à indução de mutações com o objectivo de melhorar a produção de um determinado metabolito. A quantidade de metabolitos produzidos pelas estirpes selvagens é geralmente muito baixa devido a mecanismos de autoregulação do metabolismo, sendo, desta forma, objectivo do melhoramento aumentar o fluxo metabólico, no sentido da produção do produto desejado.

A radiação UV corresponde a uma ferramenta muito útil no isolamento de mutantes de culturas microbianas. A fonte de radiação UV mais frequentemente usada para a mutagénese emite radiação UV na faixa de 260nm. Normalmente, são utilizadas doses de radiação UV que promovem de 90 a 95% de mortes na população celular, sendo que os mutantes são seleccionados dentro do conjunto de sobreviventes. (Madigan *et al*, 2000).

Este procedimento experimental divide-se em 3 partes: a determinação do efeito mutagénico na capacidade de produção de antibiótico, na capacidade de síntese de proteases extracelulares e na capacidade de síntese de lipases extracelulares por microrganismos isolados do solo.

3.3.1. Determinação do efeito da radiação da luz UV na produção de antibióticos por microrganismos do solo, por dois métodos distintos

i) Material/equipamento:

- 24 placas de Petri com meio NA (*Nutrient Agar*) + Incorporação de *Micrococcus luteus*
- 2 placas de Petri estéreis
- 100ml de meio NB
- culturas de microrganismos produtores de antibiótico (obtidas no procedimento 3.1)
- Lamparina
- Vasador (diâmetro aproximadamente de 5mm)
- Álcool etílico a 95%
- Micropipeta P200 e pontas estéreis
- Caneta de acetato
- Cronómetro
- Autoclave
- Câmara com luz UV (anexo VIII)

ii) Obtenção das culturas de microrganismos produtores de antibiótico

1. Semear o microrganismo produtor de antibiótico seleccionado numa placa de Petri com meio NA.
2. Incubar à temperatura ambiente durante 3 dias.

Os microrganismos produtores de antibiótico foram obtidos mediante isolamento a partir das placas de Petri com microrganismos do solo sujeitos a bioensaio (ponto 3.1).

iii) Obtenção de mutantes após radiação com luz UV

1. Inocular 100ml de meio NB com uma colónia do microrganismo seleccionado e incubar durante 36 horas à temperatura ambiente (pré-inóculo).

Idealmente dever-se-ia determinar a densidade óptica do pré-inóculo, de forma a estimar a concentração celular do mesmo. Desta forma, seria possível determinar o tempo necessário de incubação para que o microrganismo se encontrasse na sua fase exponencial (fase em que as células se encontram mais resistentes), a uma D.O. aproximadamente igual a 1.0. No entanto, devido ao facto dos laboratórios das escolas não possuírem espectrofotómetro, são apresentados ao longo do procedimento, tempos de incubação estimados.

2. Preparar 5 placas de Petri com meio NA, inoculadas por incorporação com uma concentração conhecida de células da estirpe indicadora.
3. Após solidificação do meio de cultura, fazer 2 poços na placa de meio (com o auxílio de um vazador de aproximadamente 5mm de diâmetro) em posições equidistantes.
4. Colocar 60µl de amostra num dos poços de cada uma das 5 placas de Petri, identificando-o como “controlo”.
5. Verter 5ml da cultura do microrganismo seleccionado numa placa de Petri estéril.
6. Submeter a amostra da cultura à luz ultravioleta durante 12 minutos retirando 60 µl da amostra em diferentes intervalos de tempo (30”, 1’, 2’30”, 6’ e 12”).
7. Inocular os 60µl da amostra de cada um dos tempos de exposição no restante poço de cada uma das 5 placas de Petri.
8. **Durante todo o procedimento manter a amostra irradiada ao abrigo da luz**, minimizando, desta forma, a ocorrência de mecanismos de reparação do material genético das células irradiadas.
9. Incubar durante 36 horas a 37°C e observar os resultados.

O resultado é interpretado comparando o diâmetro do halo de inibição de crescimento da estirpe indicadora em torno dos poços, da amostra controlo e da amostra irradiada.

iv) Obtenção de mutantes a partir da diluição da amostra radiada com luz UV

1. Inocular 100ml de meio NB com uma colónia do microrganismo seleccionado e incubar durante 36 horas à temperatura ambiente.
2. Preparar 18 placas de Petri com meio NA, inoculadas por incorporação com uma concentração conhecida de células da estirpe indicadora e deixar arrefecer o meio.
3. Diluir a cultura inicial para concentrações apropriadas (de forma a obter colónias isoladas), semear 200 µl em placas de Petri identificadas como controlo.
4. Verter 5ml de cada diluição do microrganismo seleccionado numa placa de Petri estéril.

5. Submeter a amostra da cultura à luz UV durante 12 minutos retirando 1ml da amostra em diferentes intervalos de tempo (30", 1', 2'30", 6' e 12').
6. Semear as amostras nas placas de Petri com estirpe indicadora.

O resultado é interpretado comparando o diâmetro do halo de inibição de crescimento da estirpe indicadora em torno das colónias da amostra controlo e das amostras irradiadas dos diferentes tempos de exposição.

3.3.2. Determinação do efeito da radiação com luz UV na actividade enzimática extracelular de microrganismos

i) Material/equipamento:

- 5 placas de Petri com meio NA (*Nutrient Agar*) + leite 10%
- 5 placas de Petri com meio NA (*Nutrient Agar*) + gema de ovo
- 2 placa de Petri estéril
- 100ml de meio NB
- culturas de microrganismos com actividade proteolítica
- culturas de microrganismos com actividade lipolítica
- Lamparina
- Vasador (diâmetro de 5mm)
- Álcool etílico a 95%
- Micropipeta P200 e pontas estéreis
- Caneta de acetato
- Cronómetro
- Autoclave
- Câmara com luz UV (anexo VIII)

ii) Obtenção das culturas de microrganismos com actividade enzimática extracelular

1. Semear o microrganismo com actividade proteolítica seleccionado (**microrganismo 1**) numa placa de Petri com meio NA. Incubar à temperatura ambiente durante 3 dias.
2. Semear o microrganismo com actividade lipolítica seleccionado (**microrganismo 2**) numa placa de Petri com meio NA. Incubar à temperatura ambiente durante 3 dias.

Os microrganismos 1 e 2 foram seleccionados a partir das inoculações das diluições de amostras de solo em meios adequados para a detecção da degradação de determinado substrato pela acção de uma enzima específica (ponto 3.2).

iii) Obtenção dos mutantes por radiação com luz UV

1. Inocular 100ml de meio NB com uma alíquota do microrganismo 1 e seguir o mesmo procedimento para o microrganismo 2. Incubar ambos durante 36 horas à temperatura ambiente.
2. Preparar 5 placas de Petri com meio NA com leite a 10% e 5 placas de Petri com meio NA com gema de ovo. {seguir o procedimento do ponto 3.2}
3. Fazer 2 poços na placa de meio (com o auxílio de um vazador de aproximadamente 5mm de diâmetro) em posições equidistantes.
4. Colocar 60µl de amostra do microrganismo 1 num dos poços de cada uma das 5 placas de Petri com NA + leite, identificando-o como controlo.
5. Verter 5ml da cultura do microrganismo 1 seleccionado numa placa de Petri estéril.
6. Submeter a amostra da cultura à luz UV durante 12 minutos retirando 60 µl da amostra em diferentes intervalos de tempo (30", 1', 2'30", 6' e 12').
7. Verter os 60µl da amostra de cada tempo de exposição no poço que resta de cada uma das 5 placas de Petri identificando-o com o tempo de exposição a UV correspondente.

Manter, ao longo de todo este processo, a amostra irradiada ao abrigo da luz..

8. Incubar durante 36 horas à temperatura ambiente e observar os resultados.
9. Repetir o procedimento a partir do ponto 4 com amostras do microrganismo 2 utilizando as placas de Petri com NA + gema de ovo.

O resultado é interpretado comparando o diâmetro do halo em torno dos poços correspondentes à degradação do substrato pela acção da enzima produzida, da amostra controlo e das amostras irradiadas por UV.

3.3.3. Detecção de mecanismos de reparação – fotorreactivação

A **fotorreactivação** é o principal sistema de reparação directa de lesões no ADN (Beggs, 2002). Actua especificamente sobre dímeros de pirimidinas, pela acção da enzima fotolíase, na presença de luz visível, os dímeros são monomerizados directamente (Videira, 2001). É um mecanismo dependente da luz e é a principal defesa de muitos microrganismos contra danos causados por irradiação UV. Este procedimento experimental tem como objectivo detectar a presença de mecanismos de reparação do material genético dependentes da luz, nas células dos microrganismos expostos à luz UV.

O procedimento é idêntico ao descrito nos pontos 3.3.1 e 3.3.2, no entanto tendo em conta os objectivos da actividade, as amostras irradiadas com luz UV não são protegidas da radiação da luz natural, sendo que todo o procedimento, incluindo o tempo de incubação, é efectuado à luz natural, junto a uma janela ou preferencialmente junto de um foco de luz branca.

No caso da amostra do microrganismo produtor de antibiótico esta é mantida à luz natural durante as 4 primeiras horas do período de incubação, colocando-se posteriormente numa estufa a 37°C, para permitir o crescimento da estirpe indicadora.

O resultado é interpretado comparando o diâmetro do halo de inibição de crescimento da estirpe indicadora ou do halo formado pela degradação do substrato enzimático em torno dos poços, na amostra controlo e na amostra irradiada com luz ultravioleta.

3.4. Produção em pequena escala de metabolitos microbianos num biorreactor

Um biorreactor é um dos equipamentos fundamentais na Microbiologia industrial, neste ocorrem muitos processos biotecnológicos, sendo necessário que haja um rigoroso controlo dos parâmetros que afectam o crescimento celular e a síntese de produtos, é necessário que se assegure um ambiente uniforme e adequado ao microrganismo em crescimento.

Os procedimentos experimentais que se seguem têm como objectivo a produção de metabolitos à escala de laboratório por microrganismos isolados a partir de amostras de solo. Para tal, é utilizado um biorreactor (Anexo IX) em “Batch” e em “Batch alimentado”.

3.4.1. Produção de antibiótico por microrganismos do solo num biorreactor

i) Material/equipamento:

- Biorreactor (anexo IX)
- 1 frasco de 200ml
- 150 ml de meio NA
- 375 ml de meio NB
- 5 placas de Petri com meio NA (*Nutrient Agar*)
- 2 seringas de 5ml estéreis
- microtubos de 1,5 ml estéreis
- Microfiltros de 0,2µm
- Lamparina
- Vasador (diâmetro de 5mm)
- Álcool etílico a 95%
- Papel de alumínio estéril
- Micropipeta P1000 e pontas estéreis
- Caneta de acetato
- Cronómetro
- Autoclave
- Cultura em placa de *Micrococcus luteus*

ii) Preparação dos inóculos

1. Semear o microrganismo produtor de antibiótico seleccionado numa placa de Petri com meio NA. Incubar à temperatura ambiente durante 3 dias.
2. Inocular uma colónia em 100ml de meio NB e incubar à temperatura ambiente durante 36 horas.
3. Inocular uma colónia de *Micrococcus luteus* em 25ml de meio NB e incubar a 37°C durante 36 horas.

iii) Preparação do biorreactor

1. Preparar 150ml de meio NB, introduzir o meio no biorreactor e autoclavar durante 20min a 1 Atm (121°C).
2. Preparar 100ml de meio NB para stock, autoclavar durante 20min a 1 Atm (121°C), deixar arrefecer e reservar a 4°C.

iv) Processo de fermentação em Batch alimentado

1. Colocar o biorreactor e o meio “stock” à temperatura ambiente.
2. Inocular 10ml da cultura do microrganismo produtor de antibiótico no biorreactor.
3. Ligar a bomba de ar e ajustar o fluxo deste, mantendo um arejamento contínuo da solução durante 48 horas.
4. Durante as 48h do processo retirar alíquotas de 2ml, filtrar para um microtubo e reservar a 4°C.
5. Adicionar 2ml de meio sempre que for retirada uma amostra da cultura.

v) Determinação da taxa de produção de antibiótico no biorreactor

1. Preparar placas de meio NA, inoculadas por incorporação com uma concentração conhecida de células da estirpe indicadora.
2. Fazer poços na placa de agar (com o auxílio de um vazador de aproximadamente 5mm de diâmetro) em posições equidistantes.
3. Aplicar 60µl do filtrado em cada poço, identificando-o com o tempo de crescimento a que corresponde.
4. Incubar à temperatura ambiente durante 36h.

A determinação da taxa de produção de antibiótico é feita a partir da medição do diâmetro do halo de inibição do crescimento da estirpe indicadora.

3.4.2. Produção de enzimas extracelulares microbianas num biorreactor

As enzimas microbianas representam uma fracção significativa da matéria-prima em várias indústrias, como é o caso da indústria alimentar e da indústria de detergentes. A maioria das enzimas industriais são extracelulares e permanecem no meio fermentado após a remoção da biomassa o que constitui uma vantagem para o seu isolamento.

O procedimento que se segue tem o objectivo de simular um processo industrial de produção de enzimas extracelulares microbianas. Este processo será desenvolvido recorrendo a dois tipos de fermentação num biorreactor, em “batch” e em sistema “batch alimentado”.

i) Material/equipamento:

- Biorreactor (anexo IX)
- 1 frasco de 200ml
- 25 ml de meio NA
- 100 ml de meio NB
- 125 ml de meio NA + leite a 5%
- 400 ml de meio NB +leite a 5%
- 5 placas de Petri com meio NA (*Nutrient Agar*) + leite a 5%
- 2 seringas de 5ml estéreis
- microtubos de 1,5 ml estéreis
- Microfiltros de 0,2µm
- Lamparina
- Vasador (diâmetro de 5mm)
- Álcool etílico a 95%
- Papel de alumínio estéril
- 1 pinça
- Micropipeta P1000 e pontas estéreis
- Caneta de acetato
- Cronómetro
- Autoclave

ii) Preparação do inóculo

1. Semear o microrganismo com actividade proteolítica seleccionado (a partir do procedimento 3.2) numa placa de Petri com meio NA. Incubar à temperatura ambiente durante 3 dias.
2. Ao final dos 3 dias, inocular uma colónia do microrganismo em 100ml de meio NB e incubar à temperatura ambiente durante 36 horas.

iii) Preparação do biorreactor e cultura controlo

1. Preparar 150ml de meio NB + leite 5%, conforme referido no ponto 3.3.1. Introduzir o meio no biorreactor e autoclavar durante 20min a 1 Atm (121°C).
2. Preparar 150ml de meio NB + leite a 5%, conforme referido no ponto 3.3.1, num frasco (controlo) e autoclavar durante 20min a 1 Atm (121°C), deixar arrefecer.

iv) Processo de fermentação em “Batch”

1. Colocar o biorreactor e o controlo à temperatura ambiente.
2. Inocular 10ml da cultura no biorreactor e no frasco de controlo.
3. Ligar a bomba de ar e ajustar o fluxo de ar, mantendo um arejamento contínuo da solução durante 48 horas.
4. Observar e fazer registo fotográfico da tonalidade que a cultura apresenta ao longo do tempo no biorreactor comparando com o frasco controlo.

iv) Processo de fermentação em “Batch alimentado”

1. Preparar 100ml de meio NB + leite a 5% para “stock” e autoclavar.
2. Colocar o biorreactor com o meio de cultura e o frasco do meio “stock” à temperatura ambiente.
3. Inocular 10ml da cultura no biorreactor.
4. Ligar a bomba de ar e ajustar o fluxo deste, mantendo um arejamento contínuo da solução durante 48 horas.
5. Ao longo do processo e durante as 48h retirar alíquotas de 2ml, filtrar para um microtubo e reservar a 4°C.
6. Adicionar 2ml de meio sempre que se retirar amostras.

v) Determinação da taxa de produção da enzima extracelular no biorreactor

1. Preparar placas de Petri com meio NA + leite 5%.
2. Fazer poços na placa de agar (com o auxílio de um vazador de aproximadamente 5mm de diâmetro) em posições equidistantes.
3. Aplicar 100µl do filtrado em cada poço, identificando-o com o tempo de crescimento a que corresponde.
4. Incubar à temperatura ambiente durante 36h.

A determinação da taxa de produção de enzima extracelular é feita a partir da medição do diâmetro do halo de degradação do substrato formado pela acção da enzima produzida.

3.5. Aplicação das enzimas produzidas em Microbiologia industrial

Os detergentes actuais apresentam um espectro de acção e de utilização bastante amplo, além disso, estes têm uma grande vantagem pois contêm enzimas que substituem os tradicionais produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que agredem o meio ambiente e que provocam o desgaste de materiais e de instrumentos.

3.5.1. Determinação da actividade enzimática em detergentes domésticos

As enzimas produzidas pelos microrganismos têm, como já foi referido, muitas aplicações industriais. Muitos detergentes domésticos possuem enzimas de origem microbiana de forma a facilitar a sua acção, como é o exemplo da remoção de gorduras.

A incorporação de enzimas nos detergentes proporciona muitos benefícios, tais como, a redução dos gastos de energia, já que os detergentes que contêm enzimas actuam a temperaturas inferiores que os detergentes de origem química. Além disso as enzimas ao contrário de outros componentes dos detergentes, não têm um impacto negativo no tratamento das águas residuais, visto que são rapidamente biodegradáveis, sendo seguras para o meio ambiente.

Nesta actividade experimental pretende-se detectar a presença de enzimas em detergentes domésticos, partindo de uma procura de detergentes que contêm enzimas e posterior ensaio em placa de Petri. Esta actividade é muito simples, sendo facilmente exequível num laboratório escolar.

i) Material/equipamento:

- 2 placa de Petri com meio NA (*Nutrient Agar*) + leite a 5%
- 2 placas de Petri com meio NA e gema de ovo
- Seringas de 5ml estéreis
- Micropipeta P200 e pontas estéreis
- 6 tubos de ensaio com tampa
- Vasador (diâmetro de 5mm)
- Álcool etílico a 95%
- Lamparina
- 1 colher de sobremesa
- 6 porções de diferentes detergentes domésticos*
- Água destilada estéril
- Balança
- Autoclave

* Ter em atenção se os detergentes têm adição de enzimas. Essa informação pode ser consultada no rótulo e/ou no site oficial da marca do detergente em causa.

ii) Detecção da actividade enzimática

1. Preparar 2 placas de Petri com meio NA com leite a 10% e 2 placas de Petri com meio NA com gema de ovo {seguir o mesmo procedimento do ponto 3.2}.
3. Fazer 2 poços na placa de meio (com o auxílio de um vazador de aproximadamente 5mm de diâmetro) em posições equidistantes.
4. Preparar 6 tubos de ensaio com 10 ml de água destilada, autoclavar durante 20 minutos a 1 atm, 121°C.

5. Colocar 1g de detergente num tubo de ensaio identificando-o, repetir para cada amostra de detergente. Agitar a solução.
6. Colocar 100µl de amostra de detergente num dos poços das placas de Petri com NA + leite 10%. E repetir o mesmo procedimento para as placas de NA com gema de ovo.
7. Colocar 100µl de água destilada estéril no restante poço (controlo) de cada uma das placas de Petri.
8. Repetir o procedimento para os restantes detergentes.
9. Reservar as placas de Petri à temperatura ambiente e observar os resultados ao fim de 4-5 horas.

Para ambos os testes o resultado é considerado positivo se, se verificar um halo transparente em redor dos poços com amostras de detergentes.

3.6. Orçamento do material, reagentes e equipamentos

Seguidamente apresenta-se o preço aproximado do material, reagentes e equipamentos necessários para a aplicação de cada um dos procedimentos descritos.

O valor total não representa o gasto total com as actividades, visto que, como se pode observar na tabela IV-2, o preço de alguns materiais e reagentes apresentados, refere-se a lotes de cada material, tal como se encontra à venda e é mais vantajoso adquirir.

Tabela V - 2: Preço aproximado em euros do material necessário para os procedimentos experimentais

Material	Preço aproximado em euros
500 Caixas de Petri estéreis de 90mm diâmetro	52,73
Espalhador de vidro	1,75
Ansa de inoculação	3,95
Vasador de diâmetro 5mm	2,12
Pinça	1,60
Palitos de madeira (80 unidades)	0,65
12 Tubos de ensaio (16 mm)	8,67
1 suporte de tubos de ensaio	8,26
Micropipeta autoclavável, volume variável, P1000	105,00
Micropipeta autoclavável, volume variável, P200	105,00
Caixa de 200 Seringas estéreis, graduadas de 1ml	28,00
Caixa de 240 Seringas estéreis, graduadas de 5ml	25,37
Filtro para seringa de poro com 0,22µm e 17mm de diâmetro, 50 unidades.	46,69
250 unidades Microtubos de 1,5 ml	3,20
Copo de vidro, 250ml	2,59
Pipeta 10ml	1,22
Frascos de vidro autoclaváveis, 500ml	6,44
Frascos de vidro autoclaváveis, 250ml	5,31
Frascos de vidro autoclaváveis, 100ml	5,02
Cartolina preta	0,40
Papel de alumínio 20 m	1,75
Algodão 200g	0,69
Lamparina, 125ml	2,75

Equipamentos	Preço aproximado em euros
Autoclave Microclave, 7l	1065,77
Panela de pressão Artame 7,5l	49,99
Estufa Modelo INCUBAT. Com temperaturas reguláveis até aos 80°C. com estabilidade de $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Cap. 19l. Dim. interiores (Alt.xAnch.xProf.) 30x25x25cm. Dim. exteriores (Alt.xAnch.xProf.) 50x60x44cm. Com 5 prateleiras.	704,30
Frigorífico Generic MINI NEVERA 12/220V	124,00
Balança mecânica de precisão 0,01g	123,00
Câmara com luz Ultravioleta (comprada { 20x20 cm lâmpada de 6 watt}/construída (anexo VIII))	155,54/20,20
Biorreactor 500ml (comprado/construído (anexo IX))	147,00 / 51,18
Cronómetro	10,25

Meios e reagentes	Preço aproximado em euros
Meio NA, 100g	24,17
Meio NB, 100g	22,10
<u>Meio de isolamento:</u> Caseína hidrolisada, 100g	18,80
Amido solúvel, 100g	14,70
Nitrato de potássio, 500g	41,90
Monohidrogenofosfato de potássio, 100g	29,30
Fosfato de magnésio, 100g	30,20
Carbonato de cálcio, 100g	32,10
Agar, 100g	42,50
Água destilada, 1l	1,42
Cicloheximida, 1g	52,70
<u>Meio de crescimento:</u> Glucose, 100g	17,00
Etrato de carne, 100g	57,20
Nitrato de potássio, 500g	41,90
Monohidrogenofosfato de potássio, 100g	29,30
Agar, 100g	19,00
Água destilada	1,42
Cicloheximida	52,70
Leite magro em pó 200g	1,75
Álcool étílico 98%, 250ml	0,45
Água destilada, 5 l	1,42

4.1. Caracterização da amostra de solo

Foram utilizadas duas amostras de solo, ambas recolhidas em zonas argilosas. Uma das amostras apresentava uma percentagem de húmus e humidade superior. As diferenças nos resultados entre os dois tipos de solos não foi significativa, tendo sido obtidos resultados satisfatórios com ambas as amostras. No entanto, a percentagem de microrganismos produtores de antibióticos é superior em amostras de solos com menor percentagem de húmus.

Não foi realizada a identificação dos microrganismos presentes em cada solo mas foi possível determinar a presença de odor a “terra molhada” característico da presença de geosmina, metabolito produzido por alguns actinomicetes.

4.2. Detecção da produção de antibióticos por microrganismos do solo

Com o objectivo de determinar qual o melhor procedimento para seleccionar microrganismos do solo produtores de antibiótico a partir de amostras de solo, foram utilizados dois tipos de meios de cultura. Meio de cultura selectivo para actinomicetes caracterizado pela presença de sais inorgânicos, amido como fonte de carbono, caseína não digerida como fonte de azoto e cicloheximida, antibiótico que inibe o crescimento de fungos. E meio de cultura complexo, Nutrient agar (NA).

Foram inoculados 200µl de cada uma das diluições feitas a partir de amostras de solo, em placas de Petri com meio de crescimento e com meio NA, durante 6 e 4 dias respectivamente (figura V - 3).

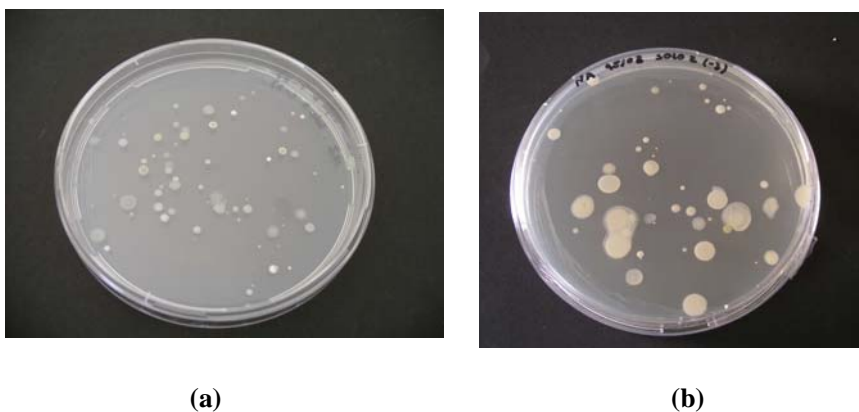


Figura V- 3: Registo fotográfico do resultado do plaqueamento da diluição 10^{-3} , da amostra de solo, obtido para cada um dos meios de cultura. (a) meio selectivo; (b) meio complexo. É evidente a maior diversidade de colónias em (b)

A metodologia utilizada na detecção da actividade antibiótica foi efectuada recorrendo a três processos diferentes. Por sobrecamada directa da estirpe indicadora nas placas obtidas das diferentes diluições; por

isolamento de algumas colónias e posterior sobrecamada com estirpe indicadora e; pela técnica do riscado. Os resultados obtidos são apresentados na figura V – 4.

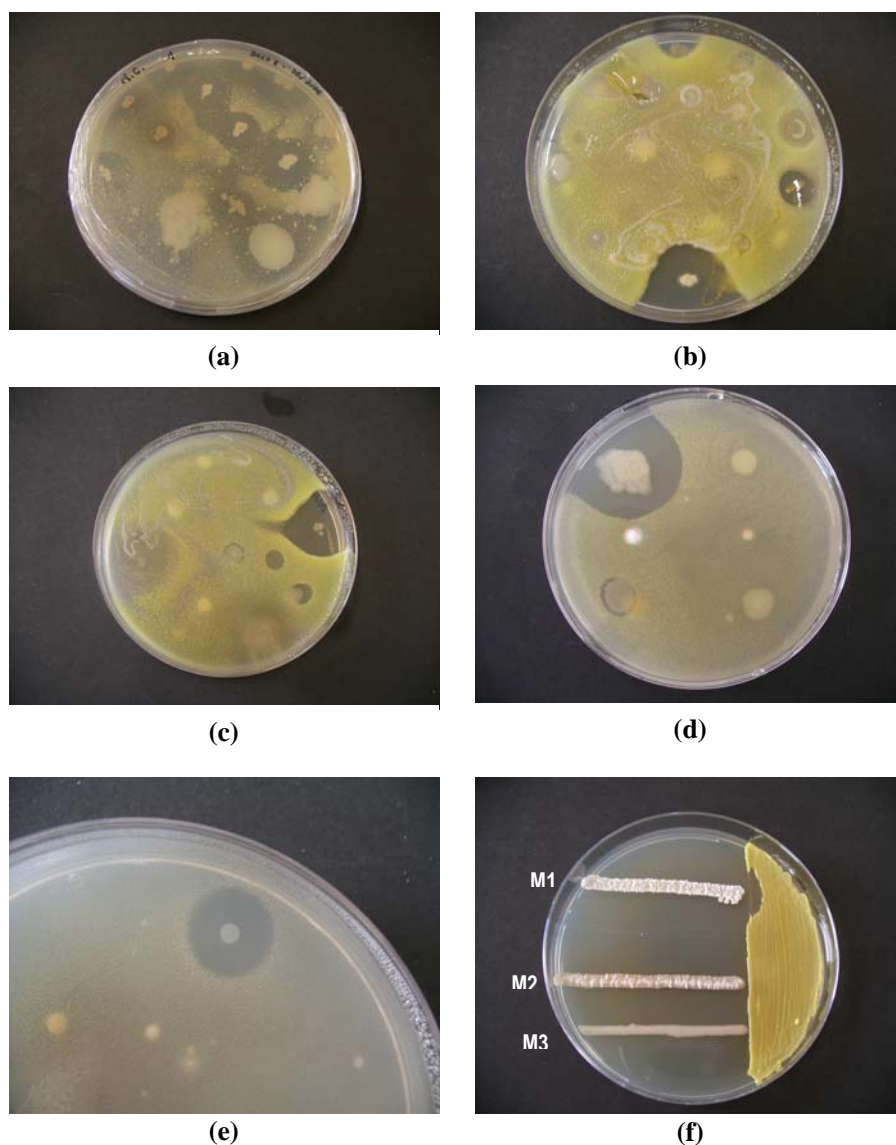


Figura V- 4: Registo fotográfico da inibição do crescimento da estirpe indicadora por acção do antibiótico produzido pelo microrganismo do solo. Em (a) bioensaio da amostra de solo, de uma diluição 10^{-3} em meio selectivo por sobrecamada directa da estirpe indicadora; (b) e (c) bioensaio da amostra de solo, numa diluição 10^{-3} em meio complexo; (d) bioensaio das colónias isoladas para identificação da actividade antibiótica a partir do crescimento em placa da amostra de solo numa diluição 10^{-3} ; (e) pormenor do halo de inibição do crescimento da estirpe indicadora devido à produção de antibiótico pelo microrganismo do solo; (f) bioensaio das colónias isoladas pela “técnica do riscado”; inibição do crescimento da estirpe indicadora devido a produção de antibiótico do microrganismo M1.

Ao analisar os resultados verificou-se que estes são satisfatórios nas três metodologias utilizadas. No entanto, com o objectivo de seleccionar o procedimento mais adequado (melhores resultados em relação à complexidade de execução, tempo de execução e gastos) para a implementação na sala de aula dever-se-á ter em conta alguns aspectos.

- O meio selectivo utilizado permite o isolamento de microrganismos pertencentes ao grupo dos actinomicetes, tendo este grupo uma grande percentagem de microrganismos produtores de antibióticos, existe uma maior probabilidade de obter bons resultados. Em contrapartida, a utilização deste meio torna-se muito dispendiosa economicamente, devido à diversidade de compostos que o constituem.
- O meio NA tem a vantagem de ser economicamente mais favorável e de fácil utilização, requerendo menos tempo ao experimentador na sua preparação.
- Observando os resultados (figura V-4) verifica-se que a estirpe de *Micrococcus luteus*, cresce melhor no meio não selectivo, obtendo-se resultados muito favoráveis, embora a abundância de produtores de antibióticos seja menor neste caso.
- No solo existe uma grande diversidade de microrganismos, ao inocular numa placa uma amostra de solo irão crescer diversos microrganismos, os quais têm forma e consistência diferentes quando cultivados em placas. Ao executar o teste com o microrganismo sensível por sobrecamada na placa de agar, obtida directamente da diluição da amostra, poder-se-á correr o risco de, devido à presença de microrganismos com uma consistência mais leitosa, estes se espalhem pela placa, tornando os resultados menos evidentes (figura V-4 (b) e (c)). Ao isolar algumas colónias para uma nova placa de Petri minimiza este risco, sendo desta forma um aspecto positivo a ter em conta para a obtenção de melhores resultados.
- Com a técnica do riscado obtêm-se resultados muito satisfatórios, no entanto, é um procedimento que envolve maior destreza por parte do experimentador.

4.3. Actividade enzimática extracelular

Para a detecção de actividade proteolítica e lipolítica extracelular dos microrganismos do solo foram utilizados dois tipos de meios. O primeiro rico em proteínas, constituído por NA e leite magro, utilizado para a detecção da actividade das proteases e o segundo rico em lípidos, constituído por NA e gema de ovo, utilizado para a detecção da actividade das lipases.

4.3.1. Confirmação da actividade proteolítica

Algumas colónias apresentaram actividade proteolítica extracelular, confirmada pela formação de um halo transparente em redor da colónia (figura V- 5). A maior ou menor actividade proteolítica de cada colónia é medida em função do tamanho do diâmetro do halo de degradação do substrato formado por acção da enzima produzida (figura V- 6).

Com as amostras de solo utilizadas nos ensaios realizados verificou-se que as diluições mais adequadas foram 10^{-2} e 10^{-3} , com as quais se obteve uma boa observação dos halos de degradação do substrato por acção da enzima produzida. No entanto, este factor de diluição pode variar dependendo do tipo de solo utilizado. Verificou-se também que a melhor concentração de leite magro no meio é a de 10%, pois é aquela que apresenta melhores resultados (figura V-5).

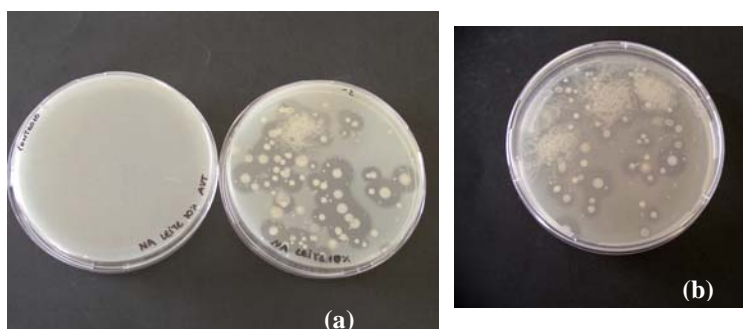


Figura V- 5: Registo fotográfico da actividade proteolítica de microrganismos do solo, em (a) podemos observar a placa controlo na qual não foi feita inoculação (à esquerda) e a placa inoculada (à direita) na qual é comprovada a actividade proteolítica pela formação de halos de degradação do substrato por acção da enzima produzida em redor de colónias no meio com proteínas - NA + Leite magro a 10% (a) e 5% (b), numa diluição da amostra a 10^{-2} .



Figura V- 6: Registo fotográfico do pormenor do halo formado no meio devido à actividade proteolítica de microrganismos do solo. Meio de cultura com leite magro numa concentração de 10% onde cresceram os microrganismos da diluição 10^{-3} . (\longleftrightarrow) indica o diâmetro do halo de degradação do substrato, sendo neste caso de 1,2 centímetros).

4.3.2. Confirmação da actividade lipolítica

Algumas colónias apresentaram actividade lipolítica extracelular, confirmada pela formação de um halo incolor em redor da colónia (figura V- 7). Com as amostras de solo utilizadas nos ensaios realizados verificou-se que a diluição mais adequada para a observação dos halos de degradação do substrato por acção da enzima produzida, foi a de 10^{-2} podendo estas variar devido ao tipo de solo utilizado.



Figura V- 7: Registo fotográfico da actividade lipolítica de microrganismos do solo, podemos observar a placa controlo na qual não foi feita inoculação (à esquerda) e a placa inoculada (à direita) na qual é comprovada a actividade lipolítica pela formação de halos de degradação do substrato em redor de colónias no meio com gema de ovo, numa diluição da amostra a 10^{-2} .

4.4. Determinação do efeito mutagénico da luz UV – selecção de mutantes

A selecção de mutantes foi feita de acordo com medição do diâmetro do halo de inibição da estirpe indicadora, no caso da produção de antibiótico e de acordo com a medição do diâmetro do halo de degradação das proteínas e lípidos, na produção de proteases e lipases extracelulares, respectivamente. Desta forma, os resultados registados para os mutantes podem ser directamente comparados com os obtidos para a amostra que não foi sujeita à acção da luz UV.

4.4.1. Determinação do efeito mutagénico da luz UV em microrganismos produtores de antibióticos

As culturas utilizadas no teste com UV e a cultura da estirpe indicadora foram obtidas utilizando meio de cultura líquido complexo, o NB (Nutrient broth), e foram incubadas as primeiras à temperatura ambiente e as segundas a 37°C, temperatura indicada para o crescimento da estirpe indicadora (anexo VII).

Foram efectuados dois ensaios utilizando dois microrganismos produtores de antibiótico seleccionados a partir das culturas de microrganismos de solo sujeitas a bioensaio.

Duas amostras de 5 ml, das culturas dos dois microrganismos produtores de antibiótico, foram irradiadas durante 12 minutos com luz UV. Retiraram-se alíquotas de 60µl das culturas ao longo de 12 minutos de exposição à luz UV, as quais foram aplicadas em placas de Petri contendo a estirpe indicadora, para efectuar o

bioensaio. O processo de recolha e posterior incubação das amostras irradiadas foi realizado ao abrigo da luz, minimizando assim os mecanismos de reparação genética dos possíveis danos causados pela luz UV. Visto que um dos primeiros mecanismos de reparação genética é a fotorreactivação, mecanismo este dependente da luz.

Os resultados dos ensaios efectuados foram analisados com o objectivo de determinar qual o efeito da radiação UV na produção de antibiótico (tabela V- 3).

Tabela V -3: Representação dos diâmetros do halo de inibição da estirpe indicadora obtidos em dois ensaios com microrganismos produtores de antibiótico isolados a partir do solo sujeitos a radiação ultravioleta (30'', 2'30'', 6' e 12') e controlo.

Ensaio/tempo	Ensaio 1					Ensaio 2				
	Controlo	30''	2'30''	6'	12'	Controlo	30''	2,30''	6'	12'
Diâmetro do halo de inibição (cm)	1,8	1,8	1,6	1,5	1,2	2,0	2,0	2,1	2,4	1,8

Em ambos os ensaios o diâmetro do halo de inibição da estirpe indicadora aos 30 segundos foi o mesmo que o obtido na amostra controlo, ou seja, a radiação da luz UV durante os 30 segundos não causou danos no material genético das células que alterassem a taxa de produção de antibiótico.

Quando observamos, na tabela V-3, o tempo de irradiação de 12 minutos verifica-se uma diminuição do halo de inibição da cultura irradiada em relação ao controlo o que indica que as células irradiadas sofreram danos irreversíveis levando-as à inibição da produção de antibiótico e/ou à morte.

A figura V – 8, correspondente ao ensaio 2 e mostra que, quando a amostra foi irradiada durante 6 minutos o diâmetro do halo de inibição correspondente à cultura irradiada é maior em relação ao controlo, o que indica a ocorrência de alteração no material genético das células irradiadas, a qual induziu um aumento na produção de antibiótico.

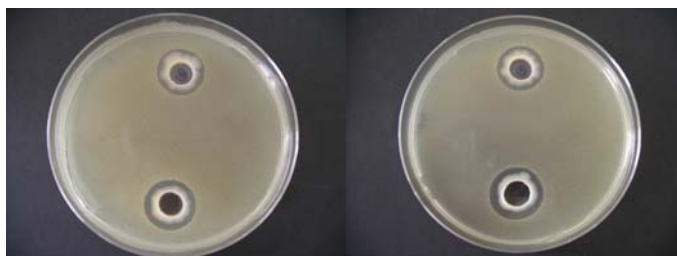


Figura V- 8: Registo fotográfico do bioensaio da cultura do microrganismo irradiado com luz UV, o poço superior de cada placa de Petri correspondem à amostra controlo (amostra não sujeita a radiação), os poços inferiores correspondem a amostras irradiadas durante 30'' e 6', respectivamente.

A ocorrência de morte celular no tempo de radiação de 12' com a luz UV foi evidente quando se observou uma diminuição da densidade celular nas margens do poço correspondente em relação ao poço controlo.

Alguns factores são determinantes para a obtenção de resultados precisos, tais como a espessura e a inclinação do agar na placa de Petri.

Quando se induzem mutações nas células de uma cultura, estas não são afectadas uniformemente, podendo os efeitos da mutação provocar diferentes tipos de danos, este facto não é possível observar com o procedimento descrito. Para eliminar os factores referidos e permitir uma melhor interpretação dos resultados foi elaborado e testado outro procedimento com o mesmo objectivo.

A cultura do microrganismo produtor foi sujeita a diluições seriadas, as quais foram irradiadas, diferentes tempos, e inoculadas em placas de Petri com a estirpe indicadora (figura V- 9 e figura V-10).

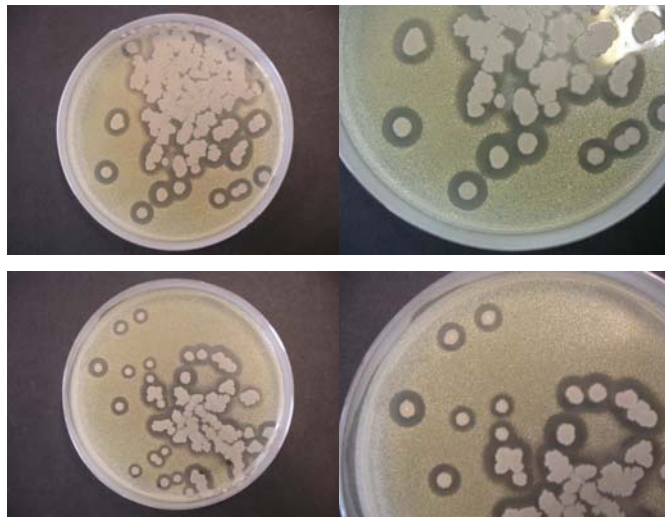


Figura V- 9: Registo fotográfico dos resultados do bioensaio de uma cultura de microrganismo produtor de antibiótico. Em cima, placa de Petri com colónias da cultura e pormenor das mesmas numa diluição 10^{-4} (amostra controlo). Em baixo, placa de Petri com colónias da cultura irradiada durante 4 minutos com luz ultravioleta numa diluição 10^{-4} .

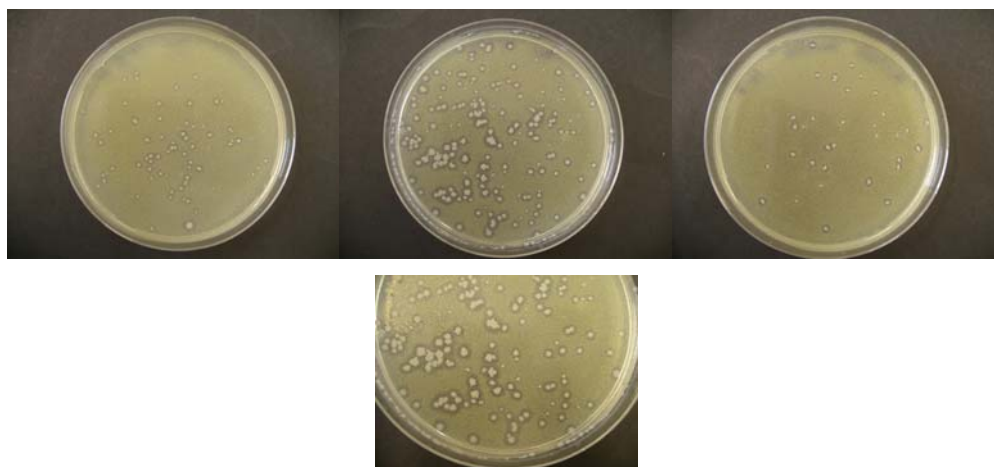


Figura V- 10: Registo fotográfico dos resultados do bioensaio de uma cultura de microrganismo produtor de antibiótico. Em cima, placas de Petri com as culturas: controlo, irradiada 4 minutos e 8 minutos respectivamente a uma diluição de 10^{-4} . Em baixo, pormenor da amostra irradiada durante 4 minutos com luz UV.

Na figura IV-9, é evidente a diminuição da produção de antibiótico por parte de algumas colónias quando comparadas entre si e a amostra *controlo*. Ao analisar os resultados da figura V-10, que representa o ensaio 2 do procedimento anterior, observa-se um aumento da produção de antibiótico num grande número de colónias quando irradiadas com luz UV durante 4 minutos. Verifica-se também uma diminuição no número de colónias, na placa de Petri inoculada com a amostra irradiada 8 minutos com luz UV, ou seja, os danos celulares causados pela luz UV foram letais para algumas das células da cultura.

4.4.2. Efeito mutagénico da luz UV em microrganismos produtores de enzimas extracelulares

i) Confirmação do efeito da luz UV na produção de proteases extracelulares

Uma colónia de um microrganismo seleccionado foi inoculada em 100ml de meio NB e incubado durante 36 horas, tempo médio para obtenção da cultura na sua fase exponencial.

Amostras da cultura foram sujeitas a radiações UV durante 12 minutos sendo retiradas amostras para teste aos 30', 2', 6' e 12'. Na figura IV-11, são apresentados os resultados obtidos para cada um dos tempos de irradiação de um dos ensaios realizados.

Ao analisar os resultados representados na figura V- 11, é evidente que a radiação da luz UV provocou danos no material genético das células que conduziram à diminuição da produção de proteases extracelulares. Foi também neste caso, realizado outro procedimento de forma a eliminar os factores referidos e permitir uma melhor interpretação dos resultados.

As amostras foram sujeitas a diluições seriadas, irradiadas e inoculadas em placas de Petri com leite magro a 10% (figura V- 11 e figura V-12).

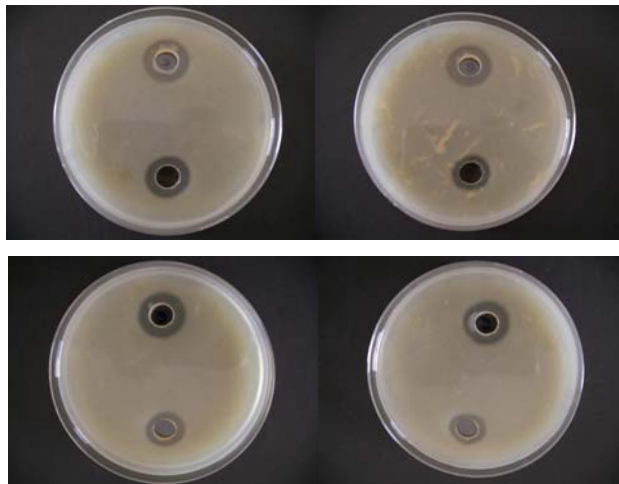


Figura V- 11: Registo fotográfico dos resultado do efeito da luz UV na produção de proteases extracelulares , o poço superior de cada placa de Petri corresponde à amostra controlo com diâmetro de degradação do substrato de 2 cm, os poços inferiores correspondem a amostras irradiadas durante 30'' (diâmetro de 1,9 cm), 2' (diâmetro de 1,6 cm), 6' (diâmetro de 1,5) e 12' (diâmetro de 1,2 cm), respectivamente.

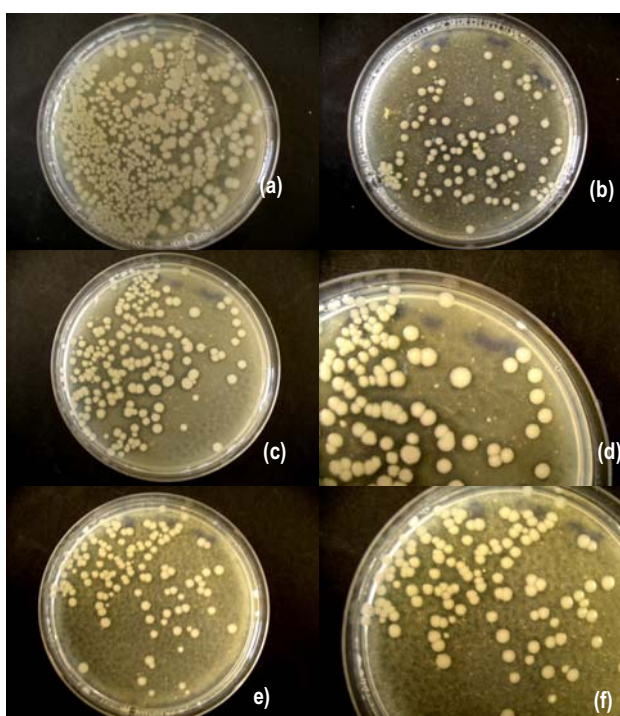


Figura V- 12: Registo fotográfico dos resultados do efeito da luz UV na produção de proteases extracelulares. Em (a) e (b) amostra controlo a uma diluição de 10^{-3} e 10^{-4} , em (c) e (d) amostra irradiada 3 minutos a uma diluição 10^{-3} , em (e) e (f) amostra irradiada 6 minutos a uma diluição 10^{-3} , respectivamente.

Ao analisar a figura V- 12 é possível observar que a irradiação da amostra com luz ultravioleta durante 3 minutos provocou o aumento da actividade enzimática de algumas células, o que não foi evidente no procedimento anterior, realizado com o mesmo microrganismo (figura V-11).

ii) Confirmação do efeito da luz UV na produção de lipases extracelulares

Uma colónia de um microrganismo seleccionado foi inoculada em 100ml de meio NB e inoculada durante 36 horas, tempo médio para obtenção da cultura na sua fase exponencial.

Amostras da cultura foram sujeitas a radiação com luz UV, durante 12 minutos, sendo retiradas amostras para análise aos 30', 2', 6' e 12'. Na figura V-13, são apresentados os resultados obtidos para cada um dos tempos de irradiação do ensaio realizado com o microrganismo isolado.

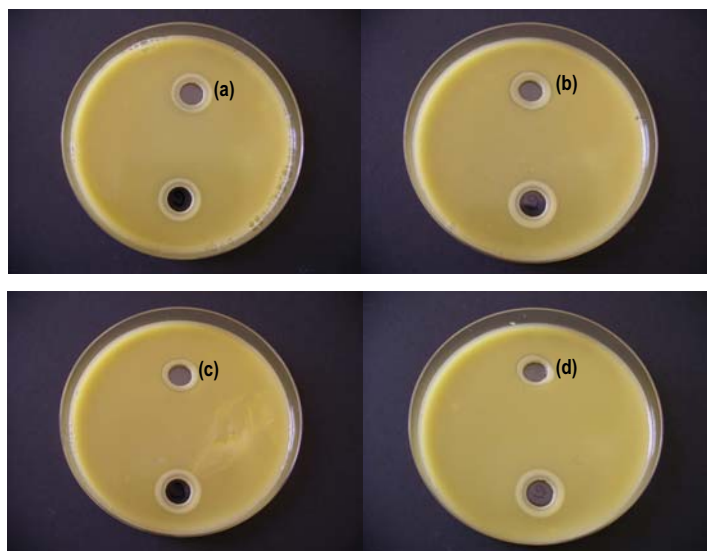


Figura V- 13: Registo fotográfico da actividade lipolítica de um microrganismo do solo quando sujeita a irradiação UV, o poço inferior de cada placa Petri corresponde à amostra controlo (amostra não sujeita a irradiação), os poços (a), (b), (c) e (d) correspondem a amostras da cultura irradiadas durante 30", 2'30", 6' e 12' respectivamente.

O resultado obtido nos diferentes ensaios mostra uma diminuição da actividade lipolítica do microrganismo ao longo dos 12 minutos de exposição (figura V- 13). No entanto, num dos ensaios efectuados observou-se uma alteração no halo de degradação do substrato, quando a amostra foi irradiada nos diferentes tempos (figura V- 14).

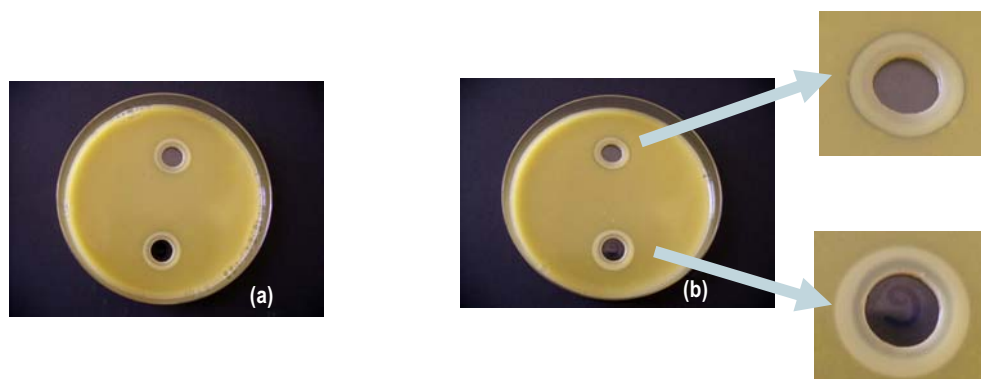


Figura V- 14: Registo fotográfico da diferença na tonalidade do halo de degradação do substrato obtida na amostra irradiada durante 1 minuto (a) e 3 minutos (b) com luz UV. A amostra controlo corresponde ao poço inferior de cada uma das placas de Petri.

Para encontrar uma justificação para o facto de, ao longo do tempo de irradiação, ocorrer alteração na tonalidade no halo de degradação do substrato por acção da enzima produzida do seu interior para a sua extremidade formando zonas diferenciadas do mesmo (figura V-14), foram levantadas duas hipóteses: quando a cultura é irradiada a alteração ocorre a nível da enzima; quando a cultura é irradiada o material genético do microrganismo sofre alterações reversíveis, sendo que numa fase inicial do período de incubação o halo é formado pela actividade da enzima que se encontrava no meio e só numa fase posterior é que o microrganismo produz mais enzima acentuando o halo formando-se assim um padrão diferente neste onde são facilmente visíveis zonas mais translúcidas e zonas mais opacas, como se observa na figura V- 14.

Para determinar os danos causados na enzima pela radiação UV, procedeu-se à remoção da mesma da cultura por centrifugação, sendo posteriormente, o sobrenadante irradiado durante 15 minutos com luz UV. No final, retiraram-se amostras de 60µl da solução contendo a enzima irradiada em diferentes tempos, as quais foram colocadas em placas de Petri com meio NA e gema de ovo.

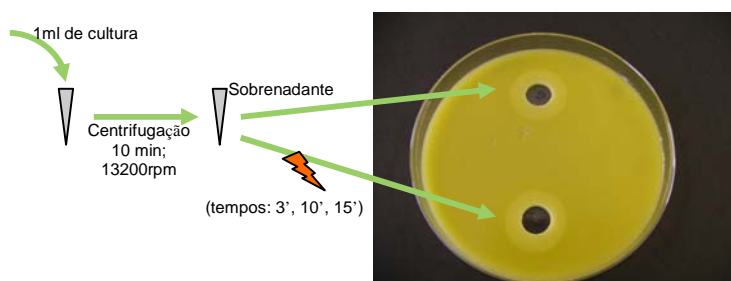


Figura V- 15: Representação esquemática do procedimento efectuado na determinação do efeito da luz UV sobre a lipase presente no sobrenadante da cultura.

Os resultados foram idênticos para todos os tempos, mostrando que a luz UV não influencia a actividade da enzima em causa.

Os resultados obtidos, levam-nos a concluir que a formação do padrão no halo de degradação do substrato ocorre quando a cultura é irradiada, levando a alterações reversíveis no material genético do microrganismo, sendo que numa fase inicial do período de incubação o halo é formado pela enzima que se encontrava no meio e só numa fase posterior é que o microrganismo produz mais enzima acentuando o halo de degradação do substrato.


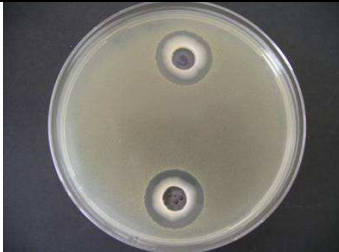




Ao direccionar estes procedimentos para uma sala de aula deve-se ter em conta que os resultados não são uniformes. Ou seja, não podemos considerar que a luz UV vá aumentar, diminuir ou inibir a produção de determinado metabolito, pois quando se trabalhar com microrganismos desconhecidos é impossível saber o que irá acontecer quando irradiados com luz UV. Contudo, poder-se-á criar entre os alunos um espírito de curiosidade levando-os a arranjar explicações para todos os resultados possíveis, ficando a conhecer desta forma, os diferentes tipos de mutações e compreender melhor os mecanismos de regulação da expressão genética.

Apesar dos resultados obtidos serem mais satisfatórios, no caso da inoculação em placas de Petri das diluições das amostras irradiadas, sugere-se que para a aplicabilidade desta experiência na sala de aula se utilize o primeiro procedimento. Visto que este é menos dispendioso, a nível de material de laboratório e menos susceptível a contaminações.

4.4.3. Confirmação da ocorrência de mecanismos de reparação

Todo o procedimento efectuado na confirmação do efeito da luz UV sobre os microrganismos produtores de determinado metabolito foi repetido, sendo desta vez a incubação das culturas irradiadas efectuada à luz natural, dando hipóteses para que o microrganismo danificado accione mecanismos de fotorreactivação. Na tabela V- 3 são apresentados os resultados que evidenciam a ocorrência de mecanismos de reparação quando o microrganismo irradiado com luz UV é exposto à luz natural. O diâmetro do halo formado em redor do poço da amostra controlo é igual, àquele que é formado em redor do poço das amostras expostas à luz natural, posteriormente à radiação com luz UV. Ou seja, na presença de luz natural o material genético do microrganismo irradiado com luz UV durante 6 minutos é reparado.

Tabela V - 3: Comparação dos resultados obtidos na confirmação do efeito da UV sobre microrganismos produtores de metabolitos (antibiótico, proteases extracelulares e lipases extracelulares) com procedimentos efectuados no escuro e à luz, evidencia da ocorrência de mecanismos de fotoreactivação.

EXPERIÊNCIA	ESCURO	LUZ
Bioensaio do microrganismo produtor de antibiótico após irradiação com UV durante 6 minutos (controlo no poço inferior da placa de Petri)	 <p>Diâmetro do halo: controlo→2 cm Teste→1,7 cm</p>	 <p>Diâmetro do halo: controlo→2 cm Teste→2 cm</p>
Ensaio do microrganismo produtor de proteases extracelulares após irradiação com UV durante 6 minutos (amostra controlo no poço inferior)	 <p>Diâmetro do halo: controlo→1,8 cm Teste→1,5 cm</p>	 <p>Diâmetro do halo: controlo→1,8 cm Teste→1,8 cm</p>
Ensaio do microrganismo produtor de lipases extracelulares após irradiação com UV durante 6 minutos (amostra controlo no poço inferior)	 <p>Diâmetro do halo: controlo→2,3 cm Teste→1,9 cm</p>	 <p>Diâmetro do halo: controlo→2,2 cm Teste→2,1 cm</p>

4.5. Produção de metabolitos num biorreactor

As fermentações foram efectuadas no biorreactor construído (anexo IX) (capacidade de 500 ml), operando em descontínuo. O biorreactor não apresenta controlo de temperatura, nem do pH, o que embora facilite o processo poderá influenciar negativamente os resultados. O arejamento efectuou-se pela alimentação contínua de ar, a partir de uma bomba de aquário, filtrado através de um filtro estéril com porosidade de 0.2 µm. A agitação resume-se à que é efectuada durante a introdução de ar no meio.

Inoculou-se o fermentador com a cultura crescida durante 36 horas em meio NB. As fermentações decorreram durante 48 horas num volume de meio de 250 ml. Retiraram-se 2 ml de amostra com seringas estéreis a diferentes tempos do processo de fermentação (2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 26h, 28h, 30h, 32h e 48h desde o início do processo), removeram-se as células e fragmentos celulares das amostras por microfiltração num filtro estéril com porosidade de 0,2µm ou por centrifugação numa centrífuga a 3200 rpm durante 10 minutos.

4.5.1. Detecção da produção de antibiótico num biorreactor em “batch alimentado”

O biorreactor com 250 ml de meio NA foi inoculado com 2 ml de cultura do microrganismo produtor de antibiótico. Ao longo de 48 horas foram retiradas amostras e efectuados ensaios em placa de Petri inoculadas com a estirpe indicadora. Sempre que foi retirada uma amostra introduziu-se 2 ml de meio NB, realimentando o sistema prosseguindo, desta forma, com o processo de fermentação em “batch alimentado”.

Tabela V - 4: Representação dos diâmetros do halo de inibição da estirpe indicadora obtidos ao longo do processo de fermentação com microrganismos produtores de antibiótico. (s. – não se formou halo)

Ensaio/tempo	2h	4h	6h	8h	24h	26h	30h	32h	48h
Diâmetro do halo de inibição (cm)	s.	1	1,2	1,2	1,6	1,8	1,8	1,6	2

Observando a tabela V-5, verifica-se um aumento progressivo na taxa de produção de antibiótico ao longo do tempo. Passadas 32 horas do início do processo verifica-se, no entanto, uma diminuição na taxa de produção. Esta é explicada pela falta de controlo de temperatura, pH e arejamento, que poderá ter levado à alteração das condições do meio de cultura inibindo a produção de antibiótico. Este efeito pode ter sido eliminado no momento em que se adicionou novo meio de cultura.

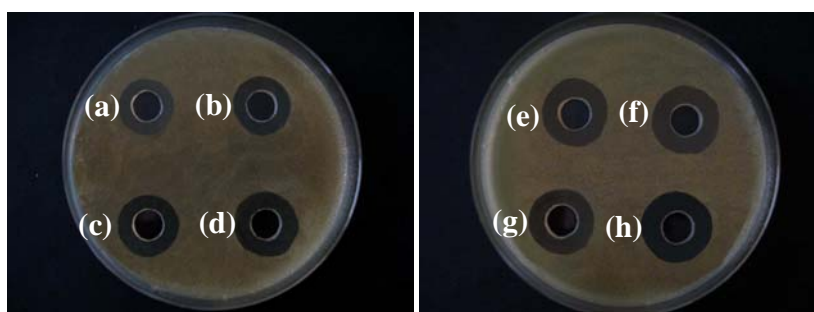


Figura V- 16 - Registo fotográfico do bioensaio das amostras da cultura do microrganismo ao longo do processo de fermentação. De (a) a (h) apresenta-se a amostra do filtrado da cultura durante 4, 6, 8, 24, 26, 30, 32 e 48 horas do início do processo de fermentação, respectivamente.

4.5.2. Confirmação da produção de proteases num biorreactor em “batch”

O biorreactor com 250 ml de meio NB com leite a 5% foi inoculado com 2 ml de cultura do microrganismo produtor de proteases extracelulares. Ao longo de 48 horas foram retiradas amostras e efectuados ensaios em placa de Petri das enzimas presentes nas amostras.

Tabela V - 5: Representação dos diâmetros do halo de degradação do substrato ao longo do processo de fermentação com o microrganismo produtor de proteases.

Ensaio/tempo	2h	4h	6h	8h	24h	26h	30h	32h	48h
Diâmetro do halo de inibição (cm)	1,2	1,2	1,6	1,9	2,4	2,4	2,6	2,5	2

Este procedimento teve por objectivo a simplificação do processo de fermentação em “batch alimentado”. Observando a tabela V-6, verifica-se que o halo de degradação do substrato aumenta ao longo do tempo. No entanto, ao fim das 48 horas este sofre uma diminuição, o que poderá ser indicativo da saturação do meio por metabolitos extracelulares produzidos pelo microrganismo e a escassez de nutrientes no meio, factores que possivelmente levaram à diminuição da produção de enzima pelo microrganismo. Os resultados também podem ser interpretados com base na observação da cultura no biorreactor.

Observando a figura V-17, verifica-se que ao longo do tempo o meio de cultura altera a sua tonalidade e cor; de branco, cor do meio NA com leite a 5%, a alaranjado, cor do meio NA. Esta alteração no meio de cultura pode estar relacionado com o envelhecimento do microrganismo, no entanto, a presença de espuma e a passagem do meio de cultura de opaco para translúcido evidencia a degradação do substrato presente no biorreactor pelas enzimas produzidas.



Figura V- 17: Registo fotográfico do biorreactor ao longo de um processo fermentativo em “batch” de produção de proteases pelo microrganismo seleccionado. A produção de proteases é acelerada pelo arejamento e agitação da cultura. Ter em atenção a alteração da tonalidade da cultura ao longo do tempo a qual indica a actividade das enzimas produzidas. Em (a) cultura no tempo zero, em (b) cultura ao fim de 24 horas, (c) cultura ao fim de 48 horas.

4.5.3. Processo de fermentação em “batch alimentado”

A cultura do microrganismo produtor de proteases extracelulares foi inoculada em 250 ml de meio NB com leite a 5% iniciando-se o processo de fermentação em “batch alimentado”.

Ao longo de 48 horas foram retiradas amostras e efectuados ensaios em placa de Petri para a presença de enzimas presentes nas amostras. Sempre que for retirada uma amostra introduziu-se 2,5 ml de meio NB com leite a 5% realimentando, desta forma, o sistema.

Observando os dados verifica-se que ocorre um aumento gradual na taxa de produção enzimática até às 24 horas do processo de fermentação. No restante tempo da fermentação ocorre uma diminuição da mesma. Este facto pode ser explicado pela influência de vários factores, alteração da temperatura, pH, o fluxo de arejamento do meio não ser o adequado para o crescimento do microrganismo e a falta de nutrientes. Neste caso, para manter o processo contínuo de produção de enzima ter-se-ia que determinar quais as condições óptimas para que o microrganismo em causa produza a enzima.

Tabela V - 6: Representação dos diâmetros do halo de degradação do substrato ao longo do processo de fermentação com o microrganismo produtor de proteases.

Ensaio/tempos	2h	4h	6h	8h	12h	24h	30h	32h	48h
Diâmetro do halo de inibição (cm)	s.	1,2	1,4	2,2	2,6	2,5	2,5	2,2	2,0

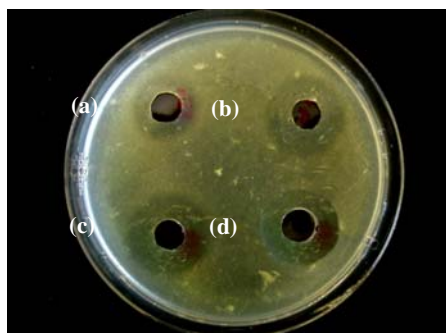


Figura V- 18: Registo fotográfico do teste de determinação da actividade enzimática do filtrado das amostras retiradas do biorreactor em diferentes tempos de crescimento. Em (a) ao fim de 4 horas, em (b) ao fim de 8 horas, em (c) ao fim de 12 horas e em (d) ao fim de 24 horas do processo de fermentação.

A aplicabilidade destas actividades para a sala de aula traz algumas limitações, visto que, existem microrganismos mais exigentes quanto as condições de crescimento e produção do metabolito desejado, não sendo os resultados tão satisfatórios. No entanto, são passíveis de desenvolver no aluno raciocínios conceptuais para determinar as razões que levaram a resultados diferentes daqueles que seriam esperados.

4.6. Determinação da actividade enzimática de detergentes domésticos

Amostras de 1g de vários detergentes contendo enzimas, foram dissolvidas em 10ml de água de forma a homogeneizar a solução. O teste para determinação da actividade enzimática foi realizado com 100µl da solução de cada detergente.



Figura V- 19:Registo fotográfico da actividade enzimática proteolítica (a) e lipolítica (b) de um detergente doméstico. Nos poços superiores encontra-se a amostra controlo (água destilada estéril) e nos poços inferiores de cada placa de Petri encontra-se a amostra teste.

Observando a figura V-19, verifica-se que o detergente contém enzimas e pela medição e comparação dos halos formados nas placas de Petri com os meios específicos para a detecção de cada actividade enzimática, proteolítica e lipolítica, pode-se inferir que a quantidade de protease presentes neste detergente é superior à de lipases.

5. As actividades experimentais na sala de aula

Como já foi referido, a realização destas actividades tiveram como principal objectivo escolher um conjunto de procedimentos experimentais mais adequados para a implementação numa sala de aula. Considerando como mais adequados aqueles que satisfazem uma melhor relação custo/exequibilidade nas escolas secundárias portuguesas.

Todas as actividades realizadas tiveram em conta a realidade das escolas, ao nível de custos, material e tempo lectivo. E com base nestes factores são feitas algumas propostas:

- A construção da câmara de luz ultravioleta, é muito simples e mais económica que as que se encontram à venda. A sua construção poderá facilmente ser realizada pelos alunos extra-aula permitindo uma maior participação do aluno na actividade, podendo mesmo gerar uma maior motivação. O procedimento para a construção da câmara de luz UV encontra-se no anexo VIII.
- A construção do biorreactor de pequena escala, também muito simples e mais económica que os biorreactores semelhantes que se encontram à venda, permite simular uma fermentação industrial. Os alunos são desta forma conduzidos para a realidade de uma indústria biotecnológica.

- A utilização de seringas estéreis em substituição das micropipetas, substancialmente mais baratas.
- A utilização de frascos de vidro de polpa de fruta, por exemplo, para autoclavar meios em substituição dos frascos específicos para o efeito, tornando desta forma a actividade menos dispendiosa.
- A substituição do autoclave por uma panela de pressão significativamente mais barata e com resultados satisfatórios.

Todos os procedimentos requerem trabalho prévio por parte do professor, necessitando este de tempo para o realizar. Adicionalmente, são necessárias noções básicas das técnicas de assépsia por parte dos alunos, os quais nem sempre as possuem.

Resta salientar, que a concepção, construção e implementação dos materiais didácticos foram realizadas segundo uma perspectiva de ensino Por Pesquisa (Cachapuz *et al.*, 2002). O guia do professor e restantes materiais foram construídos de forma a privilegiar: o estudo de situações-problema, com interesse para os alunos num contexto CTS; a explicitação e discussão das ideias dos alunos, face às situações colocadas; a argumentação e a reflexão sobre possíveis modelos explicativos; e o desenvolvimento de valores e atitudes de responsabilização pessoal e social.

Capítulo VI

Discussão geral e sugestões educacionais

Neste capítulo, apresenta-se uma discussão geral do estudo realizado, considerando os objectivos estabelecidos inicialmente. Na primeira parte discutem-se os resultados obtidos com os questionários, seguindo-se a discussão sobre a exequibilidade de procedimentos experimentais desenvolvidos no âmbito desta dissertação, com vista a serem aplicados no Ensino secundário, considerando a contextualização actual (e.g. equipamento/materiais disponíveis nas escolas). Finalmente, tecem-se considerações finais e sugestões educacionais, discutindo ainda perspectivas futuras.

Apesar das limitações que se reconhecem existir neste estudo (e.g. dimensão da população inquirida), a análise dos dados tornou possível ter informação válida sobre a opinião de professores sobre o ensino das Ciências (em particular Biotecnologia e Microbiologia) nas escolas com base no Trabalho Prático (objectivo 2, ver capítulo I) e desenvolver procedimentos experimentais adaptados à realidade das escolas e integrados nos conteúdos programáticos (objectivo 3, ver capítulo I), de forma a auxiliar o ensino da Biotecnologia e Microbiologia na disciplina de Biologia do 12º ano. Saliente-se ainda, que apenas em 2005-2006 se integrou o ensino da Biotecnologia nos programas de Ciências do ensino secundário, mais concretamente na disciplina de Biologia do 12º ano.

1. Discussão dos resultados obtidos a partir da análise do questionário de opiniões

No que respeita à caracterização da população de professores inquiridos, destaca-se uma predominância de escolas da região centro do país, aspecto que, em estudos futuros mais alargados, deveria ser ultrapassado. Houve contudo (sobretudo na Amostra 1), o cuidado de abranger escolas de zonas do interior e litoral, procurando assim uma representatividade alargada da região.

Tendo em conta a idade dos professores inquiridos, verifica-se uma predominância dos grupos etários dos 36-45 anos e 46-55 anos, predominando a faixa mais jovem na Amostra 2 (que frequentou a acção de formação). Esta análise levanta algumas questões interessantes, nomeadamente se, a nível nacional, é também, em geral, a população profissional da faixa etária entre os 36-45 anos que frequenta cursos de acção de formação, e se, a ser verdade, que influência terão, por exemplo, a motivação pessoal e/ou as potenciais vantagens que este tipo de curso pode apresentar para a progressão de carreira. Embora não podendo nem pretendendo responder as estas duas questões, seria interessante desenvolver mais estudos nesta área.

Face às questões sobre a valorização do ensino das Ciências e do Trabalho Prático, os resultados apontam para alguns aspectos que é interessante discutir. Saliente-se, por exemplo, a existência de uma atitude globalmente positiva, por parte dos professores inquiridos face ao ensino das Ciências e uma clara abertura face à responsabilidade, atitude de mudança e desenvolvimento gerada pelo ensino das Ciências e em particular do ensino da Biotecnologia e Microbiologia. A atitude positiva expressa pela maioria dos inquiridos parece estar fundamentalmente associada a questões de valorização da prática de docente,

demonstrando-se uma especial atenção pelas questões directamente relacionadas com o desenvolvimento do processo de ensino-aprendizagem com os alunos, pela utilização do Trabalho Prático como metodologia de ensino.

Por outro lado, no que se refere ao ensino das Ciências, e em particular ao ensino da Biotecnologia e da Microbiologia (questão F), os resultados demonstram que a esmagadora maioria dos professores inquiridos (cerca de 70% dos inquiridos) está fortemente sensibilizada para o papel/responsabilidade que o ensino das Ciências tem no desenvolvimento de capacidades dos alunos/cidadãos face às exigências da sociedade, no pressuposto de que o mesmo se constitui como um factor de desenvolvimento, interesse e enriquecimento da literacia científica. Esta atitude positiva por parte dos inquiridos poderá, em grande parte, ter justificação no quadro da influência da escola paralela (e.g. média), cuja importância foi recentemente destacada num trabalho de Gabriel, *et al* (2006). Tal como já referido no capítulo I desta dissertação, cada indivíduo deve ser capaz de interferir activamente na sociedade, possuir uma literacia científica que lhe permita reflectir, dar opiniões e tomar decisões. Esta tem a sua origem na escola e, o facto de cada aluno ser levado a reflectir e a desenvolver uma atitude responsável e crítica sobre assuntos tão actuais como os que se referem à Biotecnologia torná-los-á mais literados cientificamente e aptos para enfrentar a sociedade actual, o que vai de encontro com as opiniões dos professores inquiridos. Este campo tem sido objecto de preocupação por parte de decisores políticos, destacando-se na actual revisão curricular do ensino secundário, o aumento da qualidade das aprendizagens no que diz respeito “à aquisição de conhecimentos, o desenvolvimento das competências vocacionais, a capacidade de pensar cientificamente os problemas, a interiorização de uma cultura de participação e responsabilidade, a plena consciência das opções que potenciam a liberdade e o desenvolvimento dos alunos como indivíduos e como cidadãos” (DGIDC, 2003). O mesmo documento salienta ainda que esse processo de qualificação passa por uma mudança profunda nos métodos de ensino e de aprendizagem (DGIDC, 2003; Gabriel *et al*, 2006). Saliente-se ainda que os resultados aqui obtidos suportam também recomendações da Conferência Mundial sobre a Ciência para o século XXI onde se defendeu que, para um país estar em condições de atender às necessidades fundamentais da sua população, o ensino das Ciências e da Tecnologia é imperativo (*in* <http://www.unesco.org.uy/ciencias-basicas/cmc-99/budapest.pdf>).

Quanto às situações de sentido negativo, apesar de terem sido expressas por uma pequena percentagem de inquiridos (aproximadamente 5%), não se dispõe, neste estudo, de informação que justifique essa opção, podendo contudo deficiências na formação a nível pedagógico propiciar insegurança em contexto de ensino-aprendizagem e levar a uma falta de motivação por parte do professor. Um estudo mais alargado sobre a população de professores a nível nacional que partilha desta opinião e que razões subjacentes os levam/levaram a ela, seria recomendável, para, dentro do possível poderem ser tomadas

medidas de estímulo para esta questão considerada importante na união europeia (e.g. www.xplora.org e www.eurydice.org).

O actual programa de Biologia do 12º ano prevê a formação dos alunos recorrendo à construção e aprofundamento de conhecimentos de Biologia, a compreensão do valor da Ciência e o reconhecimento da relevância da Biologia e da Biotecnologia nos dias de hoje (Mendes *et al*, 2004).

No que se refere à possível existência de obstáculos na implementação do Ensino da Biotecnologia e da Microbiologia no contexto sala de aula, o estudo demonstra que a grande maioria dos professores inquiridos considera que existem obstáculos, valorizando aqueles que se relacionam com questões logísticas e falta de experiência/conhecimento do professor.

A resposta dada pelos professores inquiridos, que apontam a falta de experiência/conhecimento do professor como obstáculo no ensino da Biotecnologia, deve ser interpretada com cuidado e contextualizada com alguns aspectos importantes. Por exemplo, deve-se considerar a rapidez da evolução da Ciência nos dias de hoje (nomeadamente no campo da Biotecnologia), o facto de 2005-2006 ter sido o primeiro ano em que a Biotecnologia foi introduzida/aplicada no programa de Biologia do ensino secundário, e ainda a possibilidade de alguns dos professores inquiridos não terem tido formação inicial científica adequada nesta área, aspectos que podem fomentar uma atitude de insegurança traduzida na afirmação “falta de experiência/conhecimento do professor”. Assim, e salientando a necessidade de actualização científica e tecnológica dos conteúdos programáticos, pode questionar-se se a sua adequada implementação nas escolas requer formação contínua nessa área, para impedir a aplicação descontextualizada dos programas nas escolas. Esta hipótese pode ser sustentada não só pelo surgimento recente de acções de formação para professores no campo da Biotecnologia, mas também pelo facto dessas acções serem procuradas por professores, como ficou patente na Amostra 2 (grupo de professores que frequentou uma acção de formação sobre o ensino de Biotecnologia no 12º ano, e que considerou a falta de formação/experiência do professor como principal obstáculo para o ensino da Biotecnologia).

Relativamente à questão de realização de Trabalho Prático como ferramenta no processo ensino-aprendizagem (abrangendo as questões H a P), os resultados mostram uma evidente apetência por parte dos inquiridos para o Trabalho Prático (em detrimento doutras formas), embora seja amplamente reconhecido pelos mesmos inquiridos que a sua aplicação na sala de aula apresenta constrições de ordem prática, como por exemplo, a falta de procedimentos experimentais simples e adequados (questão J12), cumprimento dos programas (questão J11), nº de alunos por turma (questões N e O) ou ainda falta de recursos nas escolas (questão J10). É curioso salientar que a posição dos mesmos professores face ao condicionamento que o tempo lectivo (90 minutos) pode constituir para a execução de Trabalho Prático (questão P) é bastante heterogénea, havendo uma elevada percentagem de professores que não

considera ser este um obstáculo. Quanto a este aspecto, saliente-se que o programa de Biologia do 12º ano, considera que aulas de noventa minutos constituem a forma mais adequada para desenvolver dinâmicas de aprendizagem diversificadas e centradas nos alunos, nomeadamente as que pressupõem a experimentação, a pesquisa e análise de informação, a argumentação e o debate. É também referido no programa, que a concretização deste exige que exista uma gestão das dimensões teórica e prática de forma integrada, o que justifica a opção de não compartimentação de tempos lectivos para uma e outra componente (Mendes *et al*, 2004).

No âmbito da Educação em Ciências, o Trabalho Prático assume-se como importante recurso didáctico, facto reconhecido, em outros estudos (Dourado, 2006; Gabriel *et al.* 2006) quer por professores quer por investigadores, tendo um inegável valor no ensino e aprendizagem das Ciências. Também nesta investigação os professores inquiridos demonstraram estarem de acordo que a utilização do Trabalho Prático é um factor de motivação e enriquecimento do processo de ensino-aprendizagem com os alunos. Este pressuposto implica, por um lado, o reconhecimento de aprendizagens mais significativas e, por outro, as potencialidades educativas e criativas do Trabalho Prático. No entanto, a utilidade e vantagem do Trabalho Prático na sala de aula não é de aceitação unânime entre os professores inquiridos, havendo ainda alguns que reconhecem não o utilizar nas suas práticas lectivas (questão H), o que levanta algumas questões pertinentes. Por exemplo, seria interessante avaliar se uma das razões que poderá levar um professor à não realização de Trabalho Prático se prende com a falta de equipamentos e o custo destes nas escolas em que trabalham. A análise da Questão M, conjuntamente com este aspecto, suporta fortemente a hipótese formulada, embora mais estudos devam ser realizados a nível mais alargado em termos de professores, escolas e regiões do país. Ressalve-se, no entanto, que este aspecto relacionado com as carências materiais/equipamento e económicas das escolas não pode nem deve ser considerado um factor de desistência para a implementação do Trabalho Prático, tendo sido este princípio extremamente importante na definição e adaptação dos procedimentos experimentais desenvolvidos nesta dissertação. Como se demonstra no capítulo V, existem diversas formas de substituir materiais mais sofisticados e caros por outros mais simples e mais baratos, os quais, permitem obter resultados satisfatórios e muitas das vezes envolver os alunos na sua concepção promovendo neste uma maior motivação e interesse.

O facto de a esmagadora maioria dos professores inquiridos considerar que as dificuldades na implementação do Trabalho Prático também se relacionam com a falta de procedimentos experimentais na área da Biotecnologia (Questão J12), adaptados à realidade das escolas e adequados para que possam ser utilizados rotineiramente e de forma eficaz no ensino da Biotecnologia nas escolas portuguesas, vem, de certa forma, valorizar a optimização e adaptação efectuadas nos procedimentos experimentais no capítulo V desta dissertação.

Embora não tenha sido objectivo inicial desta dissertação abordar o papel das acções de formação na formação contínua dos professores em Biotecnologia, a comparação das amostras 1 e 2, levanta questões que seria interessante aprofundar num estudo mais continuado e abrangente, e onde se poderia equacionar de que forma estas acções podem dar o complemento de formação necessária aos professores, na divulgação desses procedimentos experimentais, em Biotecnologia, simples e exequíveis nas escolas. A título exemplificativo, saliente-se que a Amostra 2 demonstra uma maior sensibilidade e positivismo para a necessidade do Ensino das Ciências e da aplicabilidade do Trabalho Prático no processo de ensino aprendizagem. Esta diferença face à Amostra 1 permite pensar que acções de formação em Biotecnologia podem ter um efeito extremamente motivador nos professores. Fica no entanto, em aberto o facto da acção de formação poder ser causa ou o efeito do tipo de respostas recolhidas nesta amostra; e pelo facto dos inquiridos da Amostra 2 pertencerem, maioritariamente, a escolas bem equipadas a nível de material didáctico quando comparadas com as escolas da Amostra 1.

Concluindo, e no que concerne a importância do Trabalho Prático no ensino da Biotecnologia, existe por parte dos professores inquiridos, uma atitude globalmente positiva face à influência do Trabalho Prático nas práticas lectivas a nível do domínio cognitivo (promoção da aprendizagem de conhecimento conceptual, questões J4-J6) e do domínio atitudinal de cada aluno (J9). Este aspecto traduz-se, conjuntamente com os resultados anteriores, numa atitude positiva face ao ensino da Biologia (em particular da Biotecnologia e da Microbiologia) a qual conduz à formação de indivíduos mais aptos para enfrentar as questões científico tecnológicas que a vida em sociedade lhes coloca.

Relativamente ao tipo de aula laboratorial mais adequado à sala de aula (questões K e L), a generalidade dos inquiridos enfatiza o trabalho do aluno, em aulas centradas na resolução de problemas previamente formulados, tendo o aluno um papel essencial no processo de investigação do problema e procura de respostas. No entanto, este tipo de aula laboratorial traz algumas dificuldades tanto pela falta de formação e experiência dos professores (aspecto igualmente focado nas questões de Trabalho Prático), como pelo facto deste tipo de actividade requerer muitas aulas para a sua concretização o que dificulta a sua implementação, face à extensão dos programas curriculares, embora vá de encontro com as propostas do programa de Biologia de 12º ano.

Existe também o reconhecimento por parte dos professores inquiridos, da necessidade da existência de um intercâmbio das Universidades e outros Centros de Investigação com as Escolas. Este facto é bastante positivo visto que, além da possibilidade de aumentar a facilidade de obtenção de determinados materiais biológicos por parte das escolas, este intercâmbio permite dar a oportunidade aos professores de se manterem mais facilmente actualizados cientificamente e terem acesso a novas actividades práticas.

Finalmente, ressalve-se que neste questionário, sobretudo nas questões F e J, ao adoptar-se a escala de “Likert”, na qual os inquiridos são solicitados não só a concordarem ou discordarem das afirmações apresentadas, mas também, a informarem qual o seu grau de concordância ou de discordância, foi possível verificar a existência de uma valorização de questões, quando os inquiridos respondem “concordo totalmente” numa maior percentagem que os inquiridos que respondem “concordo”, de acordo com Carmo e Ferreira (1998). Uma maior clarificação sobre a posição dos inquiridos que responderam “concordo totalmente” face a “concordo” necessitaria de outro tipo abordagem/justificação, que transcende a natureza do inquérito utilizado. No entanto, uma possível explicação para diferenças de resposta nas categorias “concordo” face a “concordo totalmente”, pode ser o carácter mais fechado desta última (e.g. não pressupondo excepções) podendo levar o professor inquirido a optar por uma resposta que, sendo também concordante pode ser mais abrangente e/ou menos vinculativa.

2. Discussão e avaliação crítica do grau de exequibilidade dos procedimentos experimentais nas escolas secundárias

Atendendo à duração dos tempos lectivos actuais e considerando os preços dos materiais e equipamentos necessários para as actividades experimentais desenvolvidas no capítulo V, pretende-se avaliar o grau de exequibilidade das mesmas.

No que diz respeito às actividades de “Determinação da produção de antibióticos e de enzimas extracelulares por microrganismos do solo” verificou-se que as mesmas têm um procedimento muito simples, sendo necessário um investimento muito reduzido no que se refere aos materiais e equipamentos utilizados. Salienta-se, no entanto que a estufa e a balança são equipamentos que qualquer laboratório escolar minimamente equipados deve ter, tal como ficou comprovado pelos resultados obtidos no questionário de opiniões (questão M). No que diz respeito ao autoclave, este é um equipamento dispendioso mas que muitas escolas já possuem, podendo no entanto ser substituído por uma panela de pressão economicamente mais favorável.

No caso particular da actividade de “Determinação da produção de antibióticos por microrganismos do solo”, foram referidos dois tipos de meios de cultura. Em actividades similares para escolas secundários é frequente propor-se a utilização de meios de cultura selectivos (constituídos por uma grande diversidade de compostos químicos) que, sendo dispendiosos, tornam esta actividade também dispendiosa. Nesta dissertação testou-se, em paralelo um meio menos dispendioso (meio de cultura complexo, “*Nutrient Agar*”), que tendo dado resultados também positivos, torna esta actividade acessível a muitas escolas de menores recursos, tendo ainda a vantagem de necessitar menos tempo na sua preparação.

Outro aspecto a considerar, na actividade de “Determinação da produção de antibióticos por microrganismos do solo” e nas restantes actividades que envolvem um bioensaio, é o facto de existir a

necessidade de possuir uma cultura de *Micrococcus luteus*, que poderá facilmente ser arranjada por um intercâmbio entre as Universidades (e.g. Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, www.bio.ua.pt) ou outros Centros de Investigação com as escolas.

Relativamente às actividades de “Determinação do efeito mutagénico da UV na produção de antibióticos e enzimas extracelulares por microrganismos do solo”, embora sejam muito simples de efectuar necessitam de uma câmara com luz ultravioleta, equipamento este que os laboratórios das escolas não possuem. Devido a este facto, propõe-se a construção da mesma, que envolve um processo simples e pouco dispendioso (anexo VIII) quando comparado com câmaras com luz ultravioleta disponíveis no mercado, facilitando a implementação desta actividade nas escolas portuguesas e promovendo a possível interdisciplinaridade com a disciplina de Física aquando a sua construção.

As actividades que envolvem a “Produção de metabolitos a pequena escala num biorreactor” são mais exigentes tanto a nível de material e equipamento como de tempo disponível para a sua realização. Para ultrapassar esta dificuldade, sugere-se que seja construído um biorreactor (anexo IX) ficando, desta forma, a actividade menos dispendiosa. Os restantes materiais e equipamento existem normalmente nos laboratórios das escolas à excepção dos microfiltros e das seringas estéreis que terão que ser adquiridos para que a actividade seja realizada.

Como se demonstra neste estudo, para que as potencialidades do Trabalho Prático se desenvolvam não é condição necessária a existência de material muito sofisticado e laboratórios bem equipados. Existem, em diversos casos, alternativas eficientes utilizando material simples (tal como ficou demonstrado na simplicidade dos materiais e equipamentos alternativos utilizados para efectuar as actividades laboratoriais), tal como, o uso de seringas estéreis (em substituição das dispendiosas micropipetas) para medir, em todas as actividades, quantidades mínimas (ordem de μl). Embora as seringas possam levar a medições menos rigorosas consideram-se suficientes para a obtenção dos resultados pretendidos e são significativamente mais baratas. Outro exemplo é a sugestão de utilizar frascos de vidro de polpa de fruta, por exemplo, para autoclavar meios em vez de frascos específicos para esse efeito.

Por último, acresce referir que o material de vidro utilizado em qualquer uma das actividades existe normalmente nos laboratórios escolares, não acarretando maiores despesas.

3. Considerações finais e sugestões educacionais

As actuais aplicações da Biotecnologia e da Microbiologia, as suas influências e importância na sociedade, mostram o quanto é importante compreender e ensinar esta Ciência. A importância da Biotecnologia é hoje em dia valorizada pela constante divulgação dos *media* das suas enormes potencialidades. O ensino da Biotecnologia foi recentemente reconhecido no programa de Biologia no

ensino secundário, actualmente em vigor, e está salvaguardado/valorizado em documentos da União Europeia (e.g. www.xplora.org e www.eurydice.org).

Considerando o contexto socio-económico-político da sociedade actual, a literacia científica surge como uma preocupação do ensino das Ciências. A implementação de currículos que evidenciem as inter-relações entre Ciência, Tecnologia e Sociedade (CTS) surge como uma via possível para facilitar a construção desta literacia (Gabriel *et al*, 2006). No entanto, operacionalizar estes currículos no contexto da sala de aula é um processo que, apesar de se apresentar difícil e desafiador, é central no sistema educativo (Rebelo *et al*, 2005). Com este trabalho, pretendeu-se contribuir para a avaliação do reconhecimento da importância do ensino das Ciências (nas áreas de Biotecnologia e Microbiologia) nas escolas portuguesas (predominando a região centro), e sensibilizar os professores para esta importância, a nível do enriquecimento da literacia científica, promovendo ainda aspectos de cidadania. Esta sensibilização/valorização do ensino foi efectuada recorrendo a propostas de actividades laboratoriais simples que no seu conjunto se enquadram num contexto CTS e permitem o estudo de diversos conteúdos programáticos.

Como foi referido anteriormente, uma preocupação do currículo nacional de Biologia do 12º ano, é o desenvolvimento nos alunos de competências consideradas necessárias para o exercício de uma cidadania participativa e responsável, iniciada no ensino básico mas que se pretende, no ensino secundário, cimentar, aprofundando os saberes construídos, de modo a alargar a amplitude de conhecimentos e competências dos alunos, perspectivando também as suas opções de prosseguimento de estudos a nível superior (Mendes *et al*, 2004).

Um dos contextos escolares propício à aprendizagem da identificação de evidências a partir de dados e à sua utilização na construção de argumentos e ideias são as aulas de Ciências e, de um modo especial, as aulas em que é realizado Trabalho Prático (Villani e Nascimento, 2003 *in* Leite 2005). A defesa da utilização de Trabalho Prático no ensino das Ciências assenta, frequentemente, em argumentos do domínio cognitivo e atitudinal. As actividades laboratoriais, em particular, têm a potencialidade de permitir motivar os alunos, promover a aprendizagem de conhecimento conceptual e ensinar *skills* laboratoriais, metodologia científica, atitudes científicas.

No âmbito da Educação em Ciências, o Trabalho Prático assume como importante recurso didáctico, facto reconhecido, quer por professores quer por investigadores, tendo um inegável valor no Ensino e aprendizagem das Ciências. Diversos autores (e.g. Dourado, 2006) consideram que a educação científica fica incompleta se não incluir a realização de Trabalho Prático, defendendo ainda, o seu papel na formação dos alunos/cidadãos (e.g. Gabriel *et al*, 2006).

Tendo em conta os indicadores fornecidos neste estudo, a disponibilização de materiais didácticos que favoreçam o estudo de situações-problema actuais numa perspectiva CTS, permite ajudar os

professores a reflectirem sobre estratégias de ensino e aprendizagem contribuindo para a inovação das suas práticas. No entanto, o desenvolvimento de novos projectos que fomentem o valor educativo de novas metodologias no ensino da Biotecnologia torna-se ainda indispensável.

Esta atitude de abertura face à introdução do Trabalho Prático como ferramenta importante no ensino da Biotecnologia/Microbiologia nas escolas portuguesas pode, individual ou colectivamente, ter impacto no ensino destas áreas no 12º ano, apoiando Cachapuz *et al* (2002) quando defendeu que “é preciso substituir a visão tradicional do conhecimento como algo estável e seguro por algo que tem de se adaptar constantemente a diferentes contextos, cuja natureza é incerta e dotado de complexidade”, e confirmando uma efectiva necessidade de formação contínua dos professores nestas áreas.

A Ciência não é imutável nem independente da sociedade, sendo, antes, influenciada por ela e influenciando-a fortemente (nos níveis sociais, económicos e políticos). As últimas décadas foram marcadas por uma grande evolução ao nível do conhecimento científico e tecnológico, que afectou profundamente a sociedade e, inevitavelmente, a Educação em Ciência (Rebelo, 2005). Existe um consenso em relação à necessidade de se formar uma sociedade cientificamente literada, que favoreça o exercício de uma cidadania interventiva e responsável, aspecto largamente reconhecido nos países da União Europeia (e.g. www.xplora.org e www.eurydice.org).

Os currículos de Ciências não podem circunscrever-se a uma listagem de conceitos sobre os problemas que afectam a sociedade e possíveis soluções, mas sim, corresponder a propostas capazes de responder às necessidades socio-culturais, desenvolvidas numa índole investigativa, centrados na Resolução de Problemas e orientados numa perspectiva que evidencie as interacções CTS (Cachapuz *et al*, 2002). Apesar dos currículos de Ciências, na sua generalidade, já integrarem a perspectiva de ensino referida, a sua implementação tem encontrado obstáculos, tais como: a formação de professores e os recursos didácticos disponíveis (Martins, 2002). Estes obstáculos referidos por Martins (2002) confirmaram-se nos resultados dos questionários elaborados no âmbito desta dissertação, sendo assim necessário tentar encontrar soluções, que podem passar, pelo desenvolvimento de procedimentos experimentais simples, aumento do intercambio Escolas-Universidades, e formação contínua dos professores.

Os materiais didácticos assumem-se, também, como uma ajuda à implementação do currículo, uma vez que são elementos essenciais na sua operacionalização e, como tal, têm repercussões ao nível da aprendizagem. Assim, considera-se que os materiais didácticos desenvolvidos funcionem não só como material de apoio mas também como elementos de formação de professores e de inovação das suas práticas. Desta forma, os materiais didácticos permitem o desenvolvimento, por parte dos alunos, de aprendizagens que se tornem úteis e utilizáveis no quotidiano numa perspectiva de acção e promovam o desenvolvimento da literacia científica.

Actualmente o Trabalho Prático, em todas as suas vertentes, está no centro de muitos debates sobre Educação em Ciências, quer neles intervenham professores, investigadores, ou decisores políticos. Neste sentido, pretende-se acima de tudo sensibilizar os professores de Ciências, os quais são responsáveis pela função de transformar o currículo programado no currículo ensinado aos alunos. Esta atitude permite um adequado equilíbrio entre os diferentes saberes teóricos da disciplina e a eficaz articulação com o ensino experimental.

Em síntese, podemos inferir, face aos dados obtidos neste estudo, que há a necessidade de fazer chegar aos professores:

- Formação ao nível da concepção e construção de materiais didácticos inovadores, que permitam utilizar metodologias de pesquisa centradas na resolução de problemas e evidenciar as interacções CTS, no âmbito da disciplina de Biotecnologia; intercâmbio com Universidades/Institutos
- Materiais didácticos centrados em contextos de aprendizagem que proporcionem a compreensão das interacções CTS, a discussão e procura de soluções para problemas reais, a problematização, a pesquisa e organização informação.

Perspectivas futuras

Um trabalho de investigação (como o apresentado nesta dissertação) pode apresentar-se com maior ou menor valor, na perspectiva do contributo que oferece dentro da temática em que se desenrola. Se aumenta o conhecimento ou revela aspectos completamente novos nessa temática, o trabalho insere-se, então, no grupo dos trabalhos inovadores que abrem caminhos a investigações futuras, desbravando as bases primárias para posteriores actividades na respectiva área de investigação.

Quando se analisam as possibilidades que o Trabalho Prático na área da Biotecnologia oferece no campo do ensino, e dada a sua actualidade e oportunidade, imediatamente se pode questionar em que moldes se adequará nas diferentes escolas do país e de que forma se enquadraram no dia-a-dia dos alunos, para além da valorização que o professor lhe atribui e se o assimilou como recurso metodológico e pedagógico.

Um trabalho de investigação nunca se esgota, porque, de facto, nunca se conclui. No seu término, e se repetido, muitos resultados variariam (e.g. a nova aplicação dos questionários de opiniões usados nesta dissertação levaria, certamente, a resultados e conclusões diferentes dos descritos aqui). Assim, pensamos que esta abordagem só pode traduzir uma realidade temporal, localizada no contexto das amostras utilizadas. Naturalmente que o pensamento dedutivo pode levar-nos às realidades de outras escolas do país.

Este trabalho poderá ter mais significado quando se puderem comparar novos dados face à implementação, cada vez maior, do Trabalho Prático na área da Biotecnologia no mundo escolar.

Em suma, este estudo permite sugerir propostas para futuros trabalhos de investigação. Foram recolhidas opiniões acerca do Ensino das Ciências em particular da Biotecnologia e da Microbiologia a diversos professores, no entanto estes não foram confrontados com os materiais didácticos construídos. A recolha das opiniões de diversos professores confrontados com as actividades desenvolvidas e a proposta construída no Guia do professor levar-nos-ia a conhecer os obstáculos e potencialidades que em diversos contextos escolares poderão surgir, em particular para estas actividades, seria um interessante trabalho de investigação que complementaria a presente dissertação.

A implementação das actividades desenvolvidas no contexto sala de aula é, assim, o novo passo e permitirá a delineação de uma investigação nesta área, abrindo perspectivas não só para ajustes de cada actividade já desenvolvida à realidade de cada professor/escola, como, ainda, o constante desenvolvimento de novas actividades. A validação destas actividades na sala de aula, permitirá conhecer as opiniões dos alunos, avaliar os materiais construídos, recolher elementos sobre a exequibilidade e adequação dos mesmos, face aos objectivos de aprendizagem pretendidos.

Por último, admitindo ser real a falta de experiência/conhecimento por parte dos professores, relativamente ao Ensino da Biotecnologia e da Microbiologia, seria importante proceder a um estudo sobre a importância que as acções de formação realizadas, nestas áreas das Ciências, têm, o modo como esta são realizadas e até que ponto os conhecimentos adquiridos são integrados nas práticas lectivas dos formandos.

Em suma, o desenvolvimento de novos projectos que fomentem o valor educativo de novas metodologias e materiais didácticos no ensino das Ciências tornam-se ainda indispensáveis.

ALBERTS, B., JOHNSON, L., ROBERTS, R., (1998). "Essential Cell Biology an Introduction to the Molecular Biology of the Cell". Garland Publishing, Inc. New York.

ALMEIDA, A. M. (2001). "Educação em Ciências e Trabalho Experimental: Emergência de uma nova concepção". Ensino Experimental das Ciências: (Re)Pensar o Ensino das Ciências. Ministério da Educação. Departamento do Ensino Secundário. Lisboa. pp.51-71.

BALLOWS, A., TRÜPER, H., DUWORKIN, M., HARDER, H., SCHLEIFER, K. (1970). "The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications". New York: Springer-Verlag. Vol. 1, Cap 35, pp 811-815; Vol. 2, Cap56, pp 1300-1308 and Cap 76, pp 1664-1788.

BAPIRAJU, K., SUJATHA, P., ELLAIAH, P., RAMANA, T. (2004). "Mutation induced enhanced biosíntesis of lipase". Academic Journals. African Journal of Biotechnology. Vol. 3 (11), pp. 618-621. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/AJB>, [consultado em: 20/12/2006].

BEGGS, C. (2002). "A quantitative method for evaluating the photoreactivation of ultraviolet damaged microorganisms". Aerobiological Research Group. School of Civil Engineering. University of Leeds. UK. Photochem. Photobiol. Sci.. Cap 1, pp 431–437.

BELL, J. (1997). "Como realizar um projecto de investigação". Gradiva. Lisboa.

BIBB, M. (2005). "Regulation of secondary metabolism in streptomycetes". Current Opinion in Microbiology. Cap 8, pp 208–215. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>, [consultado em: 20/12/2006].

BOHINSKI, R. (1987). "Bohinski – modern concepts in biochemistry". John Carrol University. Boston. Cap 3-8.

CACHAPUZ, A., PRAIA, J., JORGE, M. (2002). "Ciência, Educação em Ciência e Ensino das Ciências". Colecção Temas de Investigação. ME. Lisboa. Cap. 1, pp 21-92.

CAMPOS, B. (1995). "A investigação educacional em Portugal". Edição do Instituto de Inovação Educacional. Colecção Ciências da Educação. 1ª edição.

CAMPOS, L. (2002). "Entender a Bioquímica", Escolar Editora, 3ª Edição, Lisboa, Cap 2.

CANAVARRO, J. M. (1999). "Ciência e Sociedade". Quarteto Editora. Coimbra. Pp.118-142.

CARMO, H., FERREIRA, M. (1998). "Metodologia da investigação – guia para auto-aprendizagem". Universidade Aberta, Lisboa.

COPPER, M. (2000). "The cell – A molecular approach". Amer. Soc. Microbiol. Washington and Sinauer

Assoc., Sunderland, MA. 2ª ed.

CORREA, R., AGOSIN, E. (2003). "Instrumentation and control of bioprocesses". Biotechnology, Ed. Horst W. Doelle. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Developed under the Auspices of the UNESCO. Eolss Publishers. Oxford. UK. Disponível em: <http://www.eolss.net>, [consultado em: 20/12/2006].

CORREIA, E., PARDAL, L: (1995). "Métodos e Técnicas de Investigação Social". Areal Editores. Porto. Pp.51-64.

DEMAIN, A. (1998). "Induction of microbial secondary metabolism". Internatl microbiol. Springer-Verlag Ibérica. Cap 1, pp 259-264.

DEMAIN, A. (2001). "Genetics and microbiology of industrial microorganisms - Molecular genetics and industrial microbiology — 30 years of marriage". Biology Department. Massachusetts Institute of Technology. Cambridge. USA. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. Cap 27, pp 352–356. Disponível em: <http://www.nature.com/jim>, [consultado em: 20/12/2006].

DGIDC (Direcção-Geral de Inovação e de Desenvolvimento Curricular) (2003). *Documento Orientador da Revisão Curricular do Ensino Secundário*. Lisboa: Ministério da Educação. pp5.

DÍAZ, M. (2002). "Enseñanza de las ciencias ¿Para qué?". Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias. Vol. 1, Nº 2.

DOURADO, L. (2001). "Trabalho Prático, Trabalho Laboratorial, Trabalho de Campo e Trabalho Experimental no Ensino das Ciências – contributo para uma clarificação de termos". Ensino Experimental das Ciências: (Re)Pensar o Ensino das Ciências. Ministério da Educação. Departamento do Ensino Secundário. Lisboa. pp13-18.

DOURADO, L. (2006). "Concepções e práticas dos professores de Ciências Naturais relativas à implementação integrada do trabalho laboratorial e do trabalho de campo", Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias, Vol. 5, Nº 1.

EISENHART, M., FINKEL, E. E MARION, S. F. (1996). "Creating the Conditions for Scientific Literacy: A Re-Examination". American Educational Research Journal. Cap 33 (2), pp. 261-295.

FERREIRA, W., SOUSA, J. (1998). "Microbiologia" Lidel edições técnicas. Lisboa. Vol 1 e 2.

FIECHTER, A. (1984). "Physical and chemical Parameters of Microbial Growth". Advances in Biochemical Engineering. Springer-Verlag. Vol. 30, pp 7-60.

FOX, D. (1981). "El proceso de investigacion en educación". Universidad de Navarra. Pamplona.

GABRIEL, A. S., SANTOS, M. C., PEDROSA, M. A. (2006). "Trabalho prático nos actuais *currícula* de ciências do ensino secundário e formação de professores. XIX CONGRESSO ENCIGA(Asociación dos Ensinantes de Ciencias de Galicia). Escola Secundária Eça de Queirós (Póvoa de Varzim, Portugal). Disponível em: <http://www.enciga.org/congresso/2006/index.htm>, [consultado em: 25/2/2007].

GHIGLIONE, R., MATALON, B. (1992). "O inquérito: Teoria e prática". Celta Editora. Oeiras.

GIL-PÉREZ, D. (1994). "The future of Science Education or why pupils reject it? in Mariano Gago, O futuro da cultura científica". Instituto de Prospectiva. Lisboa. pp. 89-97.

GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H., SUZUKI, D.T. LEWONTIN, R. C. AND GELBART, W.M. (2000). "An introduction to genetic analysis". W. H. Freeman and Company, New York.

HORST, D. (2003). "Microbial cell culture". Biotechnology. Ed. Horst W. Doelle. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Developed under the Auspices of the UNESCO. Eolss Publishers. Oxford. UK. Disponível em: <http://www.eolss.net>, [consultado em: 20/12/2006].

KIRKA, J., BEAUDETTEA, L., HARTB, M., MOUTOGLISC, P., KLIRONOMOSB, J. (2004). "Methods of studying soil microbial diversity". Department of Environmental Biology. University of Guelph. Ontario Agricultural College. Canada. Journal of Microbiological Methods. pp 169– 188. Disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth>, [consultado em: 20/12/2006].

LASZLO, E. (1997). "3rd Millennium – the Challenge and the vision". A Gaia Classic, Gaia Books Limited. London.

LEITE, L. (2001). "Contributos para uma utilização mais fundamentada do trabalho laboratorial no ensino das Ciências. Cadernos Didácticos de Ciências". DES, Ministério da Educação. Lisboa. Volume 1.

LEITE, L., ESTEVES, E. (2005). "Análise crítica de actividades laboratoriais: Um estudo envolvendo estudantes de graduação", Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias, Vol. 4, Nº 1.

LEVEAU, J., BOUIX, M., (2000). "Microbiologia Industrial –los microorganismos de interés industrial". Editorial Acribia. Zaragoza. Pp.418-470.

LIMA, N., MOTA, N. (2003). "Biotecnologia – Fundamentos e Aplicações". Lidel edições técnicas. Lisboa.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M, PARKER, J. (2000) – "Brock Biology of Microorganism", Prentice Hall International edition, Ninth Edition, Nova Iorque, Cap: 1-11.

MALA, B., APORNA, M., MOHINI, S., VASANTI, V. (1998) "Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology. Vol.62, Nº 3, pp 597-635.

MARQUES, L., PRAIA, J., VASCONCELOS, C. (2004). "La investigación como instrumento de cambio de prácticas: el trabajo práctico y la formación del profesorado". *Documentos del XII Simposio sobre enseñanza de la Geología*. pp 202-207.

MARTIN, J., DEMAINE, A. (1980). "Control of Antibiotic Biosynthesis". *Microbiological reviews*. Nº 2, Vol. 44, pp 230-251.

MARTINS, I. (2002). "Problemas e perspectivas sobre a integração CTS no sistema educativo português". *Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias*. Departamento de Didáctica e Tecnología Educativa. Universidade de Aveiro. Vol. 1 Nº 1, pp 1-13.

MARTINS, I., DIAS, C. SILVE, I. (2000). "A Biologia no ensino secundário: Tendências Curriculares, Trabalho Laboratorial e interesse dos Alunos". *Revista de Educação*. Vol.IX, nº1. Departamento de Educação da F.C. da U.L.

MEMBIELA, P. (2001). "Una revisión del movimiento CTS en la enseñanza de las Ciencias. Enseñanza de las ciencias desde la perspectiva Ciencia – Tecnología – Sociedad". *Formación científica para a ciudadanía*. Narcea, S.A. de Ediciones. Madrid. pp 91-103.

MENDES, A., REBELO, D., PINHEIRO, E. (2004). "Programa de Biologia 12º Ano: Curso Geral de Ciências Naturais". Ministério da Educação. Departamento do Ensino Secundário.

MENDO, S. (1997). "Fisiologia da produção de um antibiótico peptídico por uma estirpe de *Bacillus licheniformis* – Análise molecular de um gene biossintético". Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Lisboa. pp 3-21, 31-33, 76-91, 121-126.

MILLAR, R. (1996). "Towards a science curriculum for public understanding". *School Science Review*. 77 (280), pp 7-18.

MILLAR, R., OSBORNE, J. (1998). "Beyond 2000: Science education for the future, the report of a seminar series". Nuffield Foundation. King's College. London.

MILLER, J. D. (1994). "Scientific literacy: an updated conceptual and empirical review, in Mariano Gago, O futuro da cultura científica". Instituto de Prospectiva. Lisboa. pp. 37-57.

OLSEN, H., (2004). "Enzymes at work". Novozymes. Disponível em: <http://www.novozymes.com>, [consultado em: 20/12/2006].

PIRT, S. (1975). "Principles of microbe and cell cultivation". Blackwell. Scientific Publications.

PROSSER, J. (2002). "Molecular and functional diversity in soil micro-organisms". Department of Molecular and Cell Biology. University of Aberdeen. Institute of Medical Sciences. UK. Plant and Soil. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp 9–17.

QUIVY, R., CAMPENHOUDT, L. (1998). "Manual de Investigação em Ciências Sociais. Tradução de MARQUES, J., MENDES, A. Gradiva. Lisboa.

RAJNI, H. (2003). "Enzyme production", in Biotechnology, Ed. Horst W. Doelle, in Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO. Eolss Publishers. Oxford. UK. Disponível em: <http://www.eolss.net>, [consultado em: 20/12/2006].

RALPH, K. (2004). "Prokariote Genetic". Fundamentals of Life, Eds. Ralph Kirby, and T.G. Downing. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Developed under the Auspices of the UNESCO. Eolss Publishers. Oxford. UK. Disponível em: <http://www.eolss.net>, [consultado em: 20/12/2006].

REBELO, D., MARQUES, E., MARQUES, L. (1995). "Formação de professores: contributo de materiais didáticos para a inovação das práticas". Ensenanza de las Ciencias. VII Congreso. Número extra. pp 1-5

ROBERTIS, E., ROBERTIS, E. M. (1996). "Biologia Celular e Molecular". Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. Pp. 41-55 e 62-73.

ROUSSEAU, R. (1990). "Le Projet de Recherche. Quelques considérations sur la matière de concevoir et de rédiger un project de recherche en éducation". Les Éditions Jonathan. Canada.

SAWAN, S., MARIVANNAN, G. (2000). "Antimicrobial/Anti-infective Material – Principles, Applications and Devices". Technomic publication Company. USA. pp. 3-5, 292-311.

SILVA, I. (1999). "O Trabalho Laboratorial em Biologia no Ensino Secundário: Das Propostas curriculares às Expectativas dos Alunos". Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro.

TAGUCHI, T. (2004). "DNA Repair". Genetics and Molecular Biology. Ed. Kohji Hasunuma. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Developed under the Auspices of the UNESCO. Eolss Publishers. Oxford. UK. Disponível em: <http://www.eolss.net>, [consultado em: 20/12/2006].

UNDERKOFER, L., A., BARTON, R., R., e RENNERT, S. (1957). "Production of Microbial Enzymes and Their Applications". Microbiological Process Report. Takamine Laboratory. Division of Miles Laboratories. New Jersey.

VALADARES, J. (2002) Avaliando para melhorar aprendizagem, Quid Novi, Revista da Escola Superior de Educação de Torres Novas.

VIDEIRA, A., "Engenharia Genética – princípios e aplicações. Lidel edições técnicas. Lisboa.

WAITES, M., MORGAN, N., ROCKEY, J., HIGTON, G. (2001). "Industrial Microbiology: an introduction", Ed. Basckwell Science.

SITES CONSULTADOS, [20/12/2006]:

http://wps.prenhal.com/esm_madigan_brockbio_10

<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/MicrobeWiki>

<http://web-books.com/mobio/free/ch7f5.htm>

http://www.accessexcellence.org/AE/AEC/AEF/1994/barnard_isolation.html

<http://www.eibe.com>

<http://eurydice.org>

<http://www.ncbe.reading.ac.uk>

<http://www.unesco.org.uy/ciencias-basicas/cmc-99/budapest.pdf>

<http://www.xplora.org>

<http://www2.enq.ufsc.br/teses/d009.pdf>

QUESTIONÁRIO DE OPINIÕES

O presente questionário faz parte de um trabalho de pesquisa com vista à elaboração de uma dissertação de mestrado a apresentar à Universidade de Aveiro no âmbito do mestrado em Ensino de Biologia e Geologia.

Tem como principais objectivos avaliar a importância do Ensino da Biotecnologia no Ensino Secundário e otimizar procedimentos experimentais para implementação no processo de aprendizagem destas áreas, destinando-se a professores do 11º grupo B.

Os inquéritos são anónimos estando por isso garantida a confidencialidade das respostas, e os dados recolhidos destinam-se apenas à investigação educacional.

Solicito-lhe assim que leia atentamente as perguntas e responda, com o maior rigor possível, pois disso depende a qualidade da informação recolhida.

As suas respostas são muito importantes, por isso, agradeço desde já a sua colaboração.

Tempo médio de preenchimento: **10 minutos**
Maio/2006

A. Nome da Escola onde lecciona: _____

B. Idade (anos):

1 ☐ 18-25 2 ☐ 26-35 3 ☐ 36-45 4 ☐ 46-55 5 ☐ Mais de 55

C. Sexo:

1 ☐ Masculino 2 ☐ Feminino

D. Número de anos de serviço:

1 ☐ 0-3 2 ☐ 4-6 3 ☐ 7-25 4 ☐ 26-35 5 ☐ 36-40

E. Indique qual ou quais as disciplinas, que lecciona no presente ano lectivo.

- 1 ☐ Ciências Naturais (3ºCiclo)
- 2 ☐ Biologia e Geologia (10ºAno)
- 3 ☐ Biologia e Geologia (11ºAno)
- 4 ☐ Biologia 12ºAno
- 5 ☐ Outra (por ex. Geologia, TLBIII): _____

F. Indique o seu grau de concordância/discordância em cada frase apresentada, colocando um X no local apropriado, de acordo com a sua posição pessoal.

	Concordo totalmente	Concordo	Sem opinião	Discordo totalmente	Discordo
1- O Ensino das Ciências tem a responsabilidade de ajudar cada cidadão a desenvolver as suas capacidades face às novas exigências da sociedade.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2- É de grande interesse promover o Ensino da Biotecnologia aos alunos do Ensino Secundário.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3- É de grande interesse promover o Ensino da Genética e Microbiologia aos alunos do Ensino Secundário.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4- O Ensino da Biotecnologia promove uma sociedade mais aberta ao desenvolvimento e à mudança.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5- O Ensino da Biotecnologia desenvolve nos alunos a capacidade de enfrentar algumas questões científico-tecnológicas da actualidade.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6- É importante reflectir com os alunos os aspectos biológicos, éticos e sociais relacionados com a Biotecnologia.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7- O professor deve auxiliar o aluno a desenvolver uma atitude responsável e crítica face a questões éticas associadas à Biotecnologia.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

G. Obstáculos no ensino da Biotecnologia.

G1. Considera que existem obstáculos no ensino da Biotecnologia nas escolas portuguesas?

1 ☐ Sim 2 ☐ Não

nota: se respondeu não passe à questão H

G2. Se considera que existem obstáculos no ensino da Biotecnologia nas escolas, ordene cada item da seguinte questão de 1 (o maior obstáculo) a 5 (o menor obstáculo) de acordo com a sua posição pessoal.

- a) ☐ A complexidade dos temas associados a estas áreas
- b) ☐ A sua implementação demasiado dispendiosa
- c) ☐ Esta área não se encontra dentro do campo de experiência\conhecimento do professor
- d) ☐ Pode ser muito controverso, devido a factores éticos e morais
- e) ☐ A falta de material/equipamentos nas salas de aula

TRABALHO PRÁTICO (Laboratorial, Experimental e de Campo)

H. Se lecciona disciplinas do ensino secundário, realiza trabalho prático (laboratorial, experimental e de campo) com os seus alunos, no processo de ensino-aprendizagem?

1 ☐ Sim 2 ☐ Não

nota: se respondeu não passe à questão J

I. Se sim, em média, com que frequência o realiza, em cada turma?

- 1 ☐ Uma vez por período 3 ☐ Três vezes por período
2 ☐ Duas vezes por período 4 ☐ Outra. Indique qual: _____

J. Indique o seu grau de concordância/discordância em cada frase que é apresentada, colocando um X no local apropriado de acordo com a sua posição pessoal.

	Concordo totalmente	Concordo	Sem opinião	Discordo totalmente	Discordo
1-O uso de ferramentas didáticas motivadoras alarga a capacidade dos alunos, ajudando-os a utilizar o conhecimento em situações reais.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2- A eficácia e utilidade do trabalho prático dependem do modo como é usado.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Concordo totalmente	Concordo	Sem opinião	Discordo totalmente	Discordo
3- O uso do trabalho prático na sala de aula motiva o aluno na abordagem dos conteúdos programáticos.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4-A nível cognitivo o trabalho prático permite ilustrar conceitos, factos e princípios de uma forma mais clara.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5-A nível cognitivo o trabalho prático permite desenvolver no aluno a capacidade de análise, interpretação e discussão de resultados.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6-O trabalho prático permite a discussão de ideias, a reflexão e a avaliação crítica de todo o trabalho desenvolvido.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7- O trabalho prático é uma mais valia para o professor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8- O trabalho prático ajuda o professor no processo de ensino-aprendizagem tornando mais reais os fenómenos biológicos para os alunos.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9-O trabalho prático favorece o desenvolvimento de autoconfiança, empenho, determinação e responsabilidade no aluno.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10-A falta de recursos económicos e materiais nas escolas é a principal causa de ineficácia do trabalho prático.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11-As dificuldades na implementação do trabalho prático passam pela relação tempo/extensão dos programas.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12- A falta de procedimentos experimentais simples e adaptados à realidade das escolas na área da Biotecnologia dificulta a sua implementação na sala de aula.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13- O número actual de alunos por turma não permite a realização adequada do trabalho prático.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

K. Tendo em conta os vários tipos de aulas laboratoriais, indique quais os que considera mais adequados à sala de aula: (assinale no máximo 3 formas)

- ☐ 1. Demonstração à turma por um aluno, tendo o professor um papel de orientador.
- ☐ 2. Demonstração à turma por um grupo de alunos, tendo o professor um papel de orientador.
- ☐ 3. Demonstração à turma pelo professor.
- ☐ 4. Trabalho de grupo com procedimento experimental definido.
- ☐ 5. Trabalho de grupo com instruções do professor.
- ☐ 6. Trabalho de grupo em que os alunos planeiam e realizam experiências para dar respostas a problemas previamente formulados.
- ☐ 7. Trabalho individual, com procedimento experimental predefinido
- ☐ 8. Outros. Indique qual ou quais?_____

L. Independentemente do(s) tipo(s) que escolheu em J, refira qual a possibilidade de execução na sua escola actual.

- 1. Não é possível
- 2. É raramente possível
- 3. É possível
- 4. É bastante possível
- 5. É sempre possível
- 6. É possível mas requer um intercâmbio das Universidades e outros Centros de Investigação com as Escolas

Assinale um X no local apropriado

- ☐ 1. ☐ 2. ☐ 3. ☐ 4. ☐ 5. ☐ 6.

M. Assinale na lista de material/equipamento que se segue aqueles que não existem na sua escola.

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> 1. Tubos de ensaio | <input type="checkbox"/> 9. Pipetas graduadas |
| <input type="checkbox"/> 2. Caixas de Petri | <input type="checkbox"/> 10. Pipeta de Pasteur |
| <input type="checkbox"/> 3. Balão de Erlenmeyer | <input type="checkbox"/> 11. Provetas |
| <input type="checkbox"/> 4. Funil | <input type="checkbox"/> 12. Varetas de vidro |
| <input type="checkbox"/> 5. Ansa de inoculação | <input type="checkbox"/> 13. Micropipetas P200 |
| <input type="checkbox"/> 6. Espalhador de vidro | <input type="checkbox"/> 14. Micropipetas P1000 |
| <input type="checkbox"/> 7. Gobelés | <input type="checkbox"/> 15. Pontas para micropipetas |
| <input type="checkbox"/> 8. Copos | <input type="checkbox"/> 16. Microtubos ou "eppendorf" |

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> 17. Conta-gotas | <input type="checkbox"/> 27. Homogenizador ou liquidificadora |
| <input type="checkbox"/> 18. Estufa/Incubadora | <input type="checkbox"/> 28. Lamparina |
| <input type="checkbox"/> 19. Autoclave ou panela de pressão | <input type="checkbox"/> 29. Espectrofotómetro |
| <input type="checkbox"/> 20. Agitador | <input type="checkbox"/> 30. Cuvettes de espectrofotómetro |
| <input type="checkbox"/> 21. Balança | <input type="checkbox"/> 31. Microscópio óptico |
| <input type="checkbox"/> 22. Banho-Maria | <input type="checkbox"/> 32. Lâminas |
| <input type="checkbox"/> 23. Centrífuga | <input type="checkbox"/> 33. Lamelas |
| <input type="checkbox"/> 24. Frigorífico | <input type="checkbox"/> 34. Frascos para autoclavar |
| <input type="checkbox"/> 25. Transiluminador de luz UV | |
| <input type="checkbox"/> 26. Tina de electroforese + fonte | |

N. Considera que o número de alunos por turma condiciona a implementação de trabalho prático (laboratorial, experimental e de campo).

- ☐ Sim
☐ Não

O. Se sim. Qual considera ser o número médio de alunos para uma implementação do trabalho prático (laboratorial, experimental e de campo) com sucesso?

P. Considera que o tempo lectivo por aula actualmente (90 min) condiciona a implementação de trabalho prático?

- ☐ Sim ☐ Não

Obrigada pela sua colaboração
Sofia Silva Brites

**Anexo II – Carta enviada aos
Presidentes dos Conselhos
Executivos das Escolas que
fizeram parte do estudo**

A/C do Exmo. Senhor Presidente do Conselho Executivo

Exmo. (a) Senhor(a):

Chamo-me Sofia Silva Brites, sou professora do grupo 11ºB e frequento actualmente o Mestrado em Ensino de Geologia e Biologia da Universidade de Aveiro.

No âmbito do trabalho que estou a desenvolver com vista à elaboração da dissertação de Mestrado, sob orientação das Professoras Doutoras Maria Conceição Lopes Vieira Santos e Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, necessito de fazer uma recolha de dados a professores do grupo 11ºB que leccionem nesta escola.

O objectivo do estudo é efectuar o diagnóstico do interesse e opinião dos professores acerca das aulas de Biologia de 12ºano, dando ênfase às áreas de Genética e Biotecnologia e à utilização do trabalho prático nestas mesmas aulas.

Para poder concretizar este meu objectivo, pretendo fazer uma recolha de dados a escolas de cada um dos distritos de Aveiro e Guarda e a professores das escolas onde estão a leccionar alunos de Mestrado de Geologia e Biologia desta mesma Universidade. Neste sentido, estou a contactar V.Ex.^a, solicitando que interceda junto do professor delegado do 11º grupo B, de modo a que seja distribuído a todos os professores deste grupo o questionário em anexo.

Estima-se que o tempo necessário para os professores responderem ao questionário seja de cerca de 10 minutos.

Em anexo junto os respectivos questionários, as embalagens preparadas e seladas para devolução pelos C.T.T.

Estou certa que este meu pedido receberá a melhor atenção de V. Ex.^a, por compreender que a tarefa de produção de novo conhecimento sobre o processo de ensino-aprendizagem passa pelo envolvimento directo dos professores no processo de recolha de dados.

Agradeço, desde já, o apoio dispensado.

Com os melhores cumprimentos

Aveiro, de Fevereiro de 2006

(Sofia Silva Brites)

**Anexo III - Carta enviada aos
Professores do 11º Grupo B
que fizeram parte do estudo**

A/C do Professor Delegado do 11º Grupo B:

Caro(a) Colega:

Sou professora do 11º grupo B e frequento actualmente o Mestrado em Ensino de Geologia e Biologia da Universidade de Aveiro.

No âmbito do trabalho que estou a desenvolver com vista à elaboração da dissertação de Mestrado, sob orientação das Professoras Doutoradas Maria Conceição Lopes Vieira Santos e Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, necessito de fazer uma recolha de dados a professores do grupo 11ºB que leccionem nesta escola.

O objectivo do estudo é efectuar o diagnóstico do interesse e opinião dos professores acerca das aulas de Biologia de 12ºano, dando ênfase às áreas de Genética e Biotecnologia e à utilização do trabalho laboratorial nestas mesmas aulas.

Para poder concretizar este meu objectivo, pretendo fazer uma recolha de dados a escolas de cada um dos distritos de Aveiro e Guarda e a professores das escolas onde estão a leccionar alunos de Mestrado de Geologia e Biologia desta mesma Universidade. Neste sentido, solicito-lhe o favor de fazer chegar os questionários em anexo aos professores com as características anteriormente referidas.

Estima-se que o tempo necessário para os professores responderem ao questionário seja de cerca de 10 minutos.

Para preenchimento do referido questionário, agradecia que fossem seguidas algumas orientações:

1. A resposta deve ser individual;
2. Mesmo que alguns professores não tenham turmas de 12º ano, peço que lhes seja igualmente distribuído o questionário.

Estou certa que este meu pedido receberá a sua melhor atenção, por compreender que a tarefa de produção de novo conhecimento sobre o processo de ensino-aprendizagem passa pelo envolvimento directo dos professores no processo de recolha de dados.

Agradeço antecipadamente pela valiosa ajuda prestada, o tempo que disponibilizou, assim como a devolução pelo correio dos questionários respondidos, utilizando a embalagem em anexo, preparada para o efeito.

Com os melhores cumprimentos

Aveiro, de Fevereiro de 2006

(Sofia Silva Brites)

**Anexo IV – Tabela de definição das
variáveis do questionário**

Variáveis definidas para o questionário de opiniões

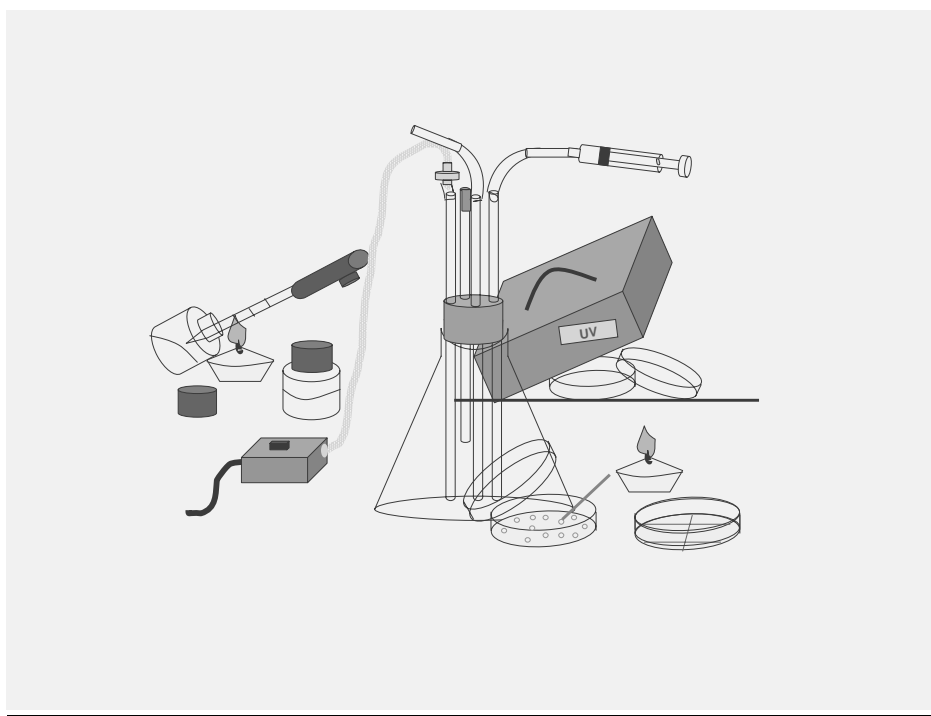
Pergunta	Nº. de variáveis	Nome da variável	Valor da variável	Categoria de resposta
A	1	Nome_Escola	Não aplicável	Nome
B	5	Idade	1= 18-25 2= 26-35 3= 36-45 4= 46-55 5= mais de 55	Resposta seleccionada = 1
C	2	Sexo	1= Masculino 2= Feminino	
D	5	Anos_serviço	1= 0-3 2= 4-6 3= 7-25 4= 26-35 5= 36-40	
E	5	Disc_lecciona	1= Ciências Naturais (3º Ciclo) 2= Biologia e Geologia (10º Ano) 3= Biologia e Geologia (11º Ano) 4= Biologia 12º Ano 5= Outra (por ex. Geologia, TLBIII)	Resposta não seleccionada = 0
F	7	F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7	1= Concordo Totalmente 2= Concordo 3= Sem opinião 4= Discordo totalmente 5= Discordo	Não resposta = X
G1 e G2	2	Diagnóst_Obstác	1= Sim 2= Não	
	5	Obstáculos	1º= A complexidade dos temas associados a estas áreas 2º= A sua implementação dispendiosa 3º= Esta área não se encontra dentro do campo de experiência/conhecimento do professor 4º= Pode ser controverso, devido a factores éticos e morais 5º= A falta de material/equipamentos nas salas de aula	Resposta = {1º, 2º, 3º, 4º, 5º} Não resposta = X
H	2	TPráctico	1= Sim 2= Não	Resposta seleccionada = 1
I	4	Freq_TPráctico	1= Uma vez por período 2= Duas vezes por período 3= Três vezes por período 4= Outra.	Resposta não seleccionada = 0
J	13	J1 J2 J3 J4 J5 J6 J7 J8 J9 J10 J11 J12 J13	1= Concordo Totalmente 2= Concordo 3= Sem opinião 4= Discordo totalmente 5= Discordo	Não resposta = X
K	8	Tipos_Aulas	1= Demonstração à turma por um aluno, tendo o professor um papel de orientador 2= Demonstração à turma por um grupo de alunos, tendo o professor um papel de orientador 3= Demonstração à turma pelo professor 4= Trabalho de grupo com procedimento experimental definido	

			5= Trabalho de grupo com instruções do professor 6= Trabalho de grupo em que os alunos planeiam e realizam experiências para dar respostas a problemas previamente formulados. 7= Trabalho individual, com procedimento experimental predefinido 8= Outros	
L	6	Possib_execução	1= Não é possível 2= É raramente possível 3= É possível 4= É bastante possível 5= É sempre possível 6= É possível mas requer um intercâmbio das universidades e outros Centros de Investigação com as Escolas	
M	33	Material_Equip	1= Tubos de ensaio 2= Caixas de Petri 3= Balão de Erlenmeyer 4= Funil 5= Ansa de inoculação 6= Espalhador de vidro 7= Gobelés 8= Copos 9= Pipetas graduadas 10= Pipeta de Pasteur 11= Provetas 12= Varetas de vidro 13= Micropipetas P200 14= Micropipetas P1000 15= Pontas para micropipetas 16= Microtubos ou "eppendorf" 17= Conta-gotas 18= Estufas 19= Autoclave ou panela de pressão 20= Agitador 21= Balança 22= Banho-Maria 23= Centrifugadora 24= Frigorífico 25= Transluminador de luz UV 26= Tina de electroforese + fonte 27= Homogenizador ou liquidificadora 28= Lamparina 29= Espectrofotómetro 30= Cuvettes de espectrofotómetro 31= Microscópio óptico 32= Lâminas 33= Lamelas 34= Frascos para autoclavar	Material que não existe = 1 Material que existe = 0
N	2	N_Alunos	1= Sim 2= Não	Resposta seleccionada= 1 Resposta não seleccionada= 0
O	1	Nmédio_Alunos	Não aplicável	Valor
P	2	Tempo_Aula	1= Sim 2= Não	Resposta seleccionada= 1 Resposta não seleccionada= 0

Nome da escola	Prof. Inquirido	K										L										M										N										O	P
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34								
ES+B SE	P1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	12	0					
	P2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0						
	P3	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1						
	P4	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1						
	P5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1						
ES+B SE	P6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1						
	P7	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	12	1							
	P8	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1							
	P9	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1							
	P10	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1						
ES+B AL	P1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1						
	P2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1						
	P3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1							
	P4	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1							
	P5	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1							
ES+B CRISTO	P1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1							
	P2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0																			

SIMULAÇÃO DE UM PROCESSO INDUSTRIAL DE BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

Guia do Professor



CONTEÚDOS

Procedimento 1: Detecção da produção de antibióticos por microrganismos do solo

Procedimento 2: Detecção da produção de enzimas extracelulares por microrganismos do solo

Procedimento 3: Determinação do efeito mutagénico da luz ultravioleta em microrganismos do solo

Procedimento 3.1: Detenção de processos de reparação – fotorreactivação

Procedimento 5: Produção em pequena escala de metabolitos num biorreactor

Procedimento 6: Detecção da presença de metabolitos em produtos domésticos

INTRODUÇÃO

O guião “**SIMULAÇÃO DE UM PROCESSO INDUSTRIAL DE BIOTECNOLOGIA MICROBIANA**” foi desenvolvido pela Professora Sofia Brites, sendo parte integrante da dissertação de mestrado em Ensino de Geologia e Biologia com a orientação da Professora Doutora Sónia Mendo e Co-orientação da Professora Doutora Conceição Santos, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Pretende-se que este guião seja utilizado por professores em escolas secundárias e se torne um recurso útil de apoio às aulas de Biologia do 12º Ano de escolaridade. Este contém informação para a preparação dos materiais e procedimentos das actividades práticas incluindo o passo a efectuar pelos alunos. Todos os procedimentos poderão ser executados individualmente ou encadeados simulando, neste caso, um processo industrial de Biotecnologia Microbiana. O professor deverá utilizar este guião como base para planificação de determinada aula, adaptando-o ao contexto dos alunos.

Procedimento 1

Detecção da produção de antibióticos por microrganismos do solo

1. Introdução

Muito microrganismos produzem antibióticos, substâncias capazes de inibir o crescimento ou matar microrganismos competidores. Muitos dos microrganismos produtores de antibiótico podem ser encontrados no solo, entre outros podemos encontrar membros do género *Streptomyces*, um dos maiores produtores de antibióticos.

2. Objectivos

Detectar a produção de antibiótico por microrganismos do solo.

3. Tempo de execução

95 minutos distribuídos por **4 momentos/aulas**. Com passo opcional, 125 minutos distribuídos por 5 momentos/aulas.

4. Conhecimentos prévios

- Reconhecimento da biodiversidade de microrganismos no solo;
- Origem e efeito dos antibióticos;
- Conhecimento das técnicas de assépsia em trabalhos de Microbiologia;

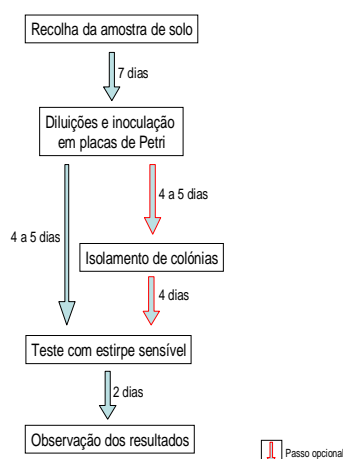


Figura 1: Esquema representativo das etapas e tempos de espera entre etapas. (todos os tempos são considerados à

5. Material/Reagentes e material biológico

Para procedimento prévio do professor:

Material: 2 frascos para meio de cultura de 500ml; 1 frasco para meio de cultura de 50ml; 1 Copo de vidro de 100ml; Caixas de Petri (6 por cada aluno ou grupo de alunos); 1 Ansa de inoculação; 5 tubos de ensaio por cada aluno ou grupo de alunos; Suporte para tubos de ensaio; 1 pipeta graduada com 10ml; Algodão; Papel de alumínio.

Equipamento: Balança; Autoclave ou panela de pressão; Lamparina

Reagentes e material biológico: Meio de cultura NA; Meio NB; Água destilada; Álcool étílico 95%; Cultura de *Micrococcus luteus*.

Nota: Se não existirem frascos de meio de cultura de 50ml ou 100ml poderá substituí-los por frasco de vidro de sumos de fruta com tampa.

Para procedimento com os alunos:

Material (por cada aluno ou grupo de alunos): Suporte para tubos de ensaio; Espalhador de vidro; 1 copo de vidro; 2 seringas estéreis de 1ml ou 1 micropipeta P1000 e pontas estéreis; Algodão.

Equipamento: Lamparina.

Reagentes e material biológico: Meio líquido NB com cultura de *Micrococcus luteus*; 6 placas de Petri com meio NA; 1 tubo de ensaio com 10 ml de água destilada esterilizado; 4 tubos de ensaio com 9ml de água destilada esterilizado, álcool étilico 95%.

6. Procedimento prévio do professor:**1ª AULA**

1. Preparar o meio NA diluindo-o em água destilada conforme indicado na embalagem (15g/L). Pesar o meio NA necessário num copo, verter para o frasco do meio de cultura e perfazer, para o volume desejado, com água destilada.

NOTA: Cada 100 ml de meio equivale a cerca de 6 placas de Petri de diâmetro 8,5 cm. Para cada aluno ou grupo de alunos vai necessitar 6 placas de Petri.

2. Preparar 5 tubos de ensaio para cada aluno ou grupo de alunos numerando-os de zero a quatro. No tubo zero adicionar 10 ml de água destilada e nos restantes tubos adicionar 9 ml, colocar a tampa.
3. Autoclavar, durante 20 minutos, o meio e os tubos de ensaio com a água destilada e uma pipeta graduada de 10ml, para cada grupo de trabalho.
4. Com todos os cuidados de assépsia, dividir o meio NA pelas placas de Petri e deixar solidificar.

2ª AULA (opcional)

1. Autoclavar cerca de 15 palitos de madeira num frasco com tampa por cada aluno ou grupo de alunos.

3ª AULA**36 horas antes da 3ª aula**

1. Preparar o meio NB conforme indicado na embalagem (30g/L) – Cada aluno ou grupo de alunos vai necessitar, aproximadamente, 0,25 ml. Preparar a quantidade total necessária no mesmo frasco e autoclavar.
2. Com todos os cuidados de assépsia utilizar uma ansa de inoculação para retirar um inóculo da placa de *Micrococcus Luteus* e adicionar ao meio NB arrefecido.
3. Incubar a cultura em meio líquido durante 36 horas a 37°C.

Momentos antes da aula

1. Preparar 50 ml de meio NA para cada aluno ou grupo de alunos.
2. Autoclavar o meio momentos antes da aula para que quando os alunos necessitarem este se encontre ainda líquido (aproximadamente 45°C), caso isso não seja possível poderá preparar o meio tempos antes deixando-o solidificar e no momento da utilização liquidificar num microondas ou então manter o meio em banho-quente a 45°C.

7. Procedimento com os alunos

RECOLHA DA AMOSTRA DE SOLO (10 minutos):

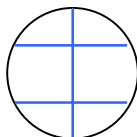
1. Recolher a amostra de solo a cerca de 10 cm da superfície, para tal escavar um buraco de cerca de 10cm de profundidade recolhendo uma porção de solo armazenando-a num saco de plástico;
2. Deixar secar o solo cerca de 1 semana num local escuro à temperatura ambiente;

1ª AULA (50 minutos):

1. Pesar 1g de solo.
2. Desinfectar a bancada de trabalho e as mãos com álcool etílico e acender a lamparina. **Atenção** o álcool é inflamável.
3. Mantendo todas as condições de assépsia, colocar a amostra de solo no tubo zero, misturar bem e deixa repousar 5 minutos;
4. Fazer a série de diluições da solução preparada no tubo zero até obteres o factor de diluição 10^{-4} . Utilizar uma seringa estéril ou a micropipeta e junto à lamparina transferir 1ml de amostra para os tubos de ensaio, partindo sucessivamente da diluição 10^{-1} para a diluição 10^{-4} .
5. Registar na base de 4 placas de Petri com meio NA: o nome do grupo e a diluição que se irá semear.
6. Agitar vigorosamente o tubo de ensaio 4 e usando uma seringa estéril ou a micropipeta transferir para uma placa 100µl da solução.
7. Repetir o mesmo procedimento que na alínea 6, para o tubo 3, tubo 2 e tubo 1. Seguir esta ordem usando sempre a mesma seringa. Não esquecer de seguir rigorosamente as técnicas de assépsia.
8. Seguidamente, deitar um pouco de álcool no copo de vidro e mergulhar a extremidade do espalhador de vidro, flamejando-o à chama
9. Deixar arrefecer o espalhador de vidro, breves segundos, e espalhar na superfície do agar a solução anteriormente introduzida.
10. Colocar as placas em posição invertida ao abrigo da luz, recreando as condições ambientais do seu habitat natural, à temperatura ambiente durante 3 a 4 dias.

2ª AULA (30 minutos):

1. Reunir os resultados da 1ª aula e reservar a placa que contiver cerca de 120 colónias no frigorífico.
2. Limpar com álcool a bancada de trabalho acender a lamparina. **Atenção** ao álcool pois este é inflamável.
3. Dividir duas placas de Petri em 6 partes, para tal marcar na base das placas com uma caneta de acetato. Tal como no esquema que se segue:



4. A partir das restantes placas isolar com um palito estéril colónias, principalmente as colónias arredondadas e com aspecto de pó de giz, para as novas placas (anexo VII).
5. Colocar as placas em posição invertida num local escuro à temperatura ambiente durante 3 dias.

3ª AULA (30 minutos):

1. Esterilizar a bancada de trabalho com álcool e acender a lamparina;
2. Reunir a placa de Petri com as colónias isoladas e a placa de Petri obtida directamente da diluição.
3. Para efectuar o teste adicionar ao frasco com 50 ml meio NA, a uma temperatura de cerca de 45°C, 0,5 ml da cultura de *Micrococcus luteus*, o microrganismo sensível, fechar o frasco e agitar levemente sem formar espuma. Ter especial atenção as técnicas de assépsia para evitar contaminações.

Nota: Atenção não deixar que a temperatura do meio baixe demasiado para que não solidifique, antes da sua utilização.

4. Verter a mistura para as placas de Petri usando a técnica da sobrecamada, de forma a cobrir todas as colónias.
5. Esperar que o meio solidifique e colocar as placas invertidas na estufa a 37°C, durante 48 horas.

4ª AULA (20 minutos):

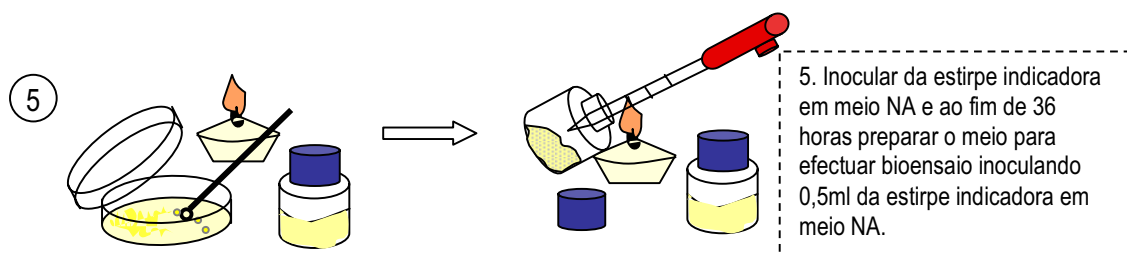
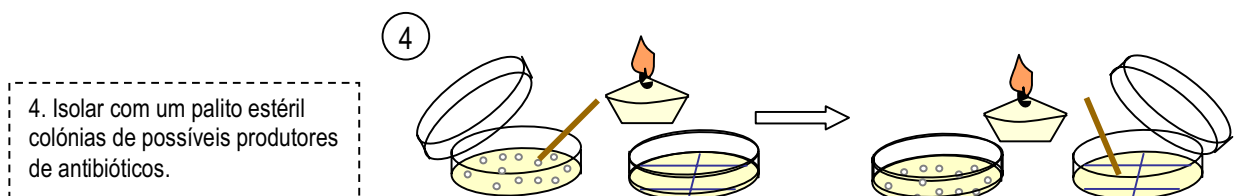
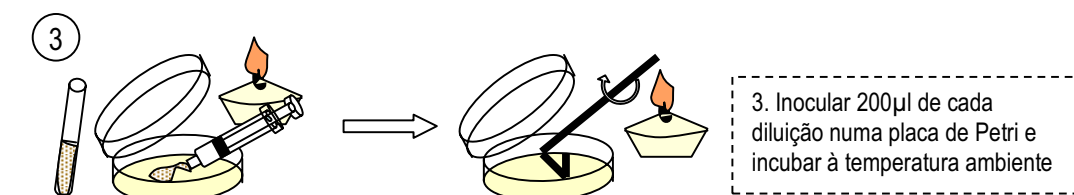
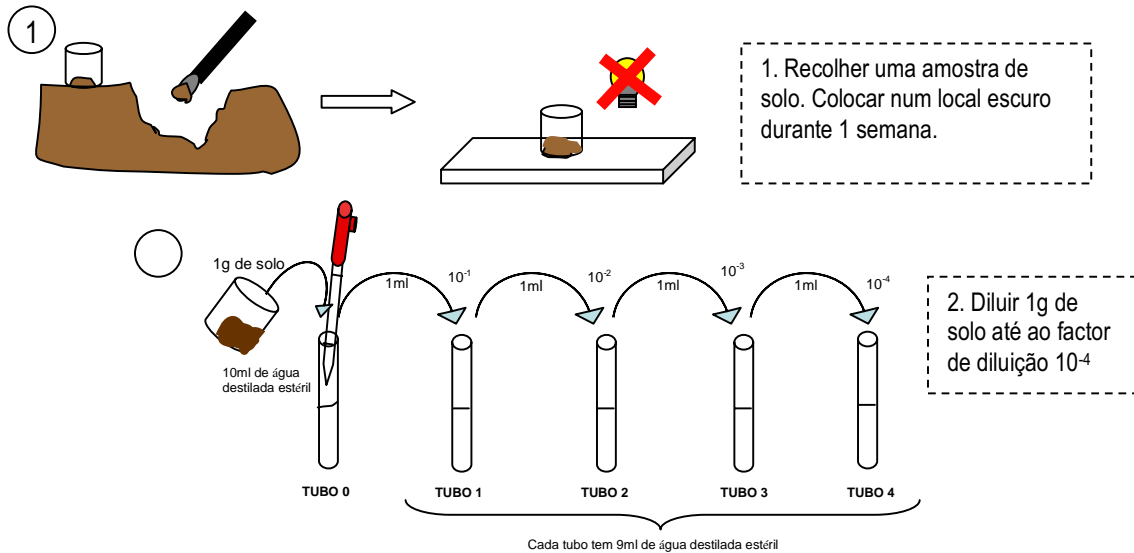
1. Observar e interpretar os resultados.

Em suma:

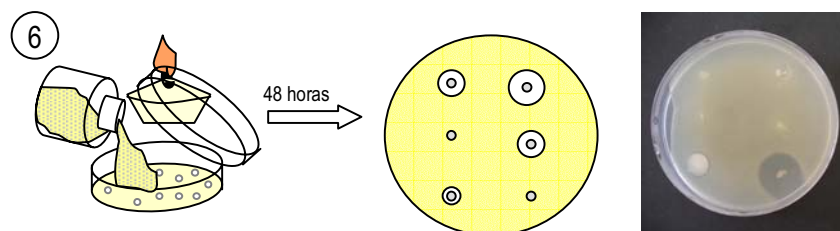
- A amostra de solo é recolhida 1 semana para secar o solo e eliminar alguns microrganismos, pois a maioria dos produtores de antibiótico produzem esporos em solos secos. Fica-se desta forma com uma maior probabilidade de obter microrganismos produtores de antibiótico em relação aos restantes microrganismos, obtendo-se melhores resultados.
- O isolamento de colónias é um passo opcional, sendo possível efectuar o teste directamente sobre as placas obtidas na fase das diluições, embora os resultados sejam mais satisfatórios com o isolamento das colónias.
- Os resultados podem ser conservadas num frigorífico (4°C) devendo ser previamente isoladas com plástico aderente.
- O *Micrococcus luteus* poderá ser conservado num frigorífico (4°C) em placa de Petri, devendo ser repicado de mês a mês.

Procedimento 1 – passo a passo

Detecção da produção de antibiótico por microrganismos do solo



6. Bioensaio: Proceder à sobrecamada da estirpe indicadora. Incubar 48 horas a 37°C. E observar resultados.



Procedimento 2

Detecção da produção de enzimas extracelulares por microrganismos do solo - proteases e lipases

1. Introdução

As enzimas são um grupo de substâncias orgânicas de natureza proteica, com actividade intra ou extracelular, que têm funções catalisadoras. Muitos microrganismos produzem enzimas extracelulares, provavelmente em resposta à adaptação a determinado habitat. Entre outras enzimas produzidas por microrganismos podemos salientar as celulases, xilanases, amilases, proteases, peptidases, lipases, queratinases, etc.

2. Objectivos

Detectar microrganismos produtores de diferentes actividades hidrolíticas extracelulares mediante um simples ensaio de crescimento em placas de Petri com meios específicos.

3. Tempo de execução

115 minutos distribuídos por **3 momentos/aulas** distintos.

4. Conhecimentos prévios

- Reconhecimento da biodiversidade de microrganismos no solo;
- Definição de enzimas;
- Conhecimento da função das enzimas;
- Conhecimento das técnicas de assépsia em trabalhos de Microbiologia

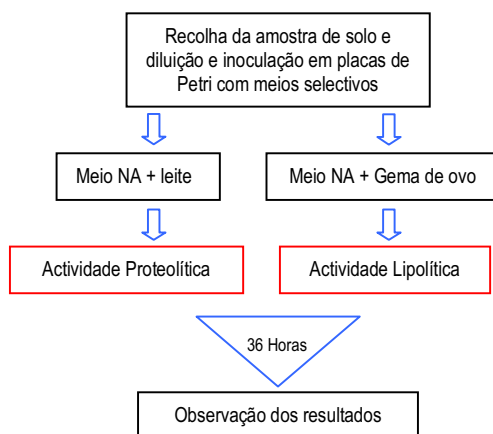


Figura 1: Esquema representativo das etapas experimentais e tempos é temperatura ambiente.

5. Material/Reagentes e material biológico

Para procedimento prévio do professor:

Material: 5 tubos de ensaio por cada aluno ou grupo de alunos; 1 suporte para tubos de ensaio; 1 pipeta graduada de 5 ml; Algodão; Papel de alumínio.

Equipamento: Autoclave ou panela de pressão; Lamparina.

Reagentes e material biológico: Água destilada; Álcool a 95%.

Para procedimento com os alunos:

Material (por cada aluno ou grupo de alunos): 8 placas de Petri; 1 Espalhador de vidro; 1 Pipeta graduada de 5 ml; 4 seringas estéreis de 1ml ou uma micropipeta P1000; Caneta de acetato;

Equipamento: Autoclave ou panela de pressão; Lamparina

Reagentes e material biológico: 1g de solo; 6g de meio NA; 200 ml de água destilada; Leite magro em pó; 1 ovo; Álcool a 95%; 1 tubo de ensaio com 10 ml de água destilada esterilizado; 4 tubos de ensaio com 9ml de água destilada esterilizado.

6. Procedimento do trabalho prévio do professor:

1. Preparar 5 tubos de ensaio para cada aluno ou grupo de alunos numerando-os de zero a quatro. No tubo zero adicionar 10 ml de água destilada e nos restantes tubos adicionar 9 ml, colocar a tampa.
2. Autoclavar, durante 20 minutos, os tubos de ensaio com a água destilada e uma pipeta graduada, para cada grupo de trabalho.

7. Procedimento com os alunos

RECOLHA DE SOLO (10 minutos):

1. Recolher a amostra de solo a cerca de 10 cm da superfície, para tal escavar um buraco de cerca de 10cm de profundidade recolhendo uma porção de solo armazenando-a num saco de plástico;

1ª AULA (90 minutos)

1. Desinfectar a bancada de trabalho e as mãos com álcool etílico e acender a lamparina. **Atenção** ao álcool pois este é inflamável.
2. Preparar os meios de cultura para a detecção de cada uma das actividades enzimáticas:
 - 2.1. Para a detecção da **actividade proteolítica**: Meio NA + Leite – preparar 100ml de meio de cultura, com 3g de NA e leite magro a uma concentração final de 10%, autoclavar o meio durante 20 minutos a 120°C, 1atm.
 - 2.2. Para a detecção da **actividade lipolítica**: Meio NA + gema de ovo – preparar 100ml de meio de cultura, com 3g de NA, autoclavar durante 20 minutos a 120°C, 1atm. e deixar arrefecer o meio até aos 50°C. Esterilizar a superfície de um ovo num copo com álcool etílico a 95% durante 5 minutos. Colocar a gema do ovo no meio de cultura e misturar bem.
3. Dividir os meios em placas de Petri e deixar arrefecer.
4. Pesar 1g de solo.
5. Mantendo todas as condições de assépsia, colocar a amostra de solo no tubo zero, misturar bem e deixar repousar 5 minutos;
6. Fazer a série de diluições da solução preparada no tubo zero até obteres o factor de diluição 10^{-4} . Utilizar a pipeta estéril e junto à lamparina transferir 1ml de amostra para os tubos sucessivamente, partindo da diluição 10^{-1} para a diluição 10^{-4} .
7. Registar na base das 4 placas de Petri com meio NA + leite: o nome e a diluição que se irá semear. Proceder do mesmo modo para o meio NA + gema de ovo.

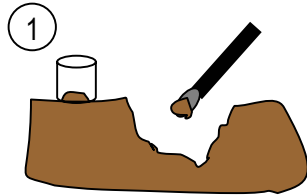
8. Usar a seringa estéril ou a micropipeta e transferir para uma placa de NA + leite e uma placa de NA + gema de ovo 200µl da solução do tubo 4, agitar bem o tubo antes de retirar.
9. Repetir o mesmo procedimento que na alínea 8, para o tubo 3, tubo 2 e tubo 1. Seguir esta ordem usando sempre a mesma seringa. Seguir rigorosamente as técnicas de assépsia.
Nota: se não for seguida esta ordem utilizar seringas estéreis para cada tubo de ensaio.
10. Seguidamente, deitar um pouco de álcool no fundo de um copo e mergulhar a extremidade do espalhador de vidro, flamejar à chama.
11. Deixar arrefecer o espalhador de vidro, breves segundos, e espalhar na superfície do agar a solução anteriormente introduzida.
12. Colocar as placas em posição invertida ao abrigo da luz, recreando as condições ambientais do seu habitat natural, à temperatura ambiente durante 36 horas.

2ª AULA (15 minutos):

1. Observar e interpretar os resultados.

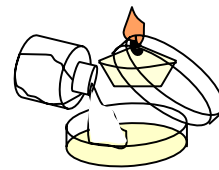
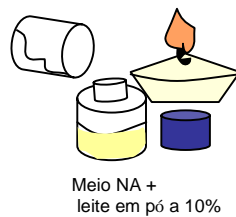
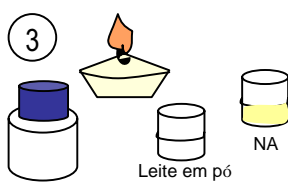
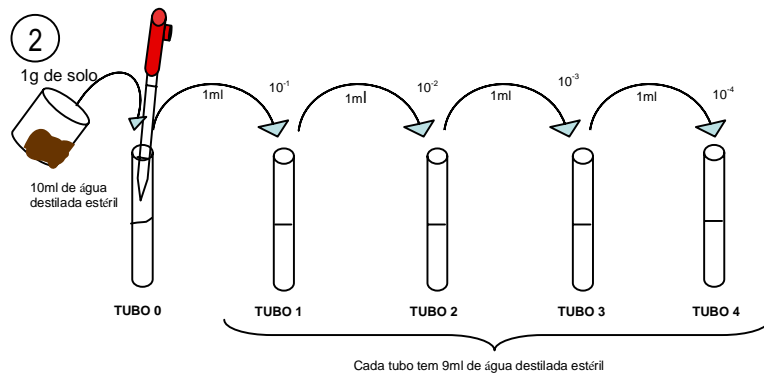
Em suma:

- Os meios de cultura poderão ser preparados previamente pelo professor, no entanto, tratando-se de meios específicos para cada actividade enzimática é interessante que seja o aluno a proceder à sua preparação.
- Caso os tempos entre as duas aulas não coincidam com o tempo de incubação os resultados poderão ser conservados num frigorífico (4°C). Aconselha-se, a proceder a um registo fotográfico no final do tempo de incubação.

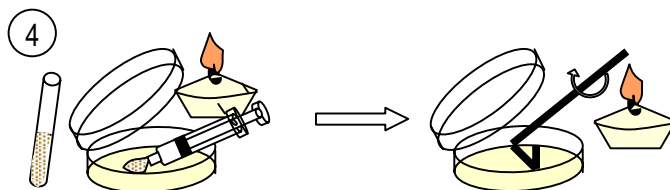
Procedimento 2 – passo a passo**2.1. Detecção da produção de proteases extracelulares por microrganismos do solo**

1. Recolher uma amostra de solo.

2. Diluir 1g de solo até ao factor de diluição 10^{-4}

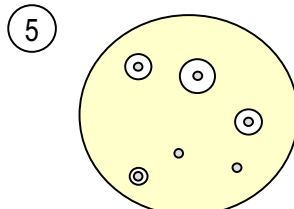


3. Preparar meio de cultura rico em proteínas. Com NA + leite em pó a 10%, autoclavar e dividir por placas de Petri.

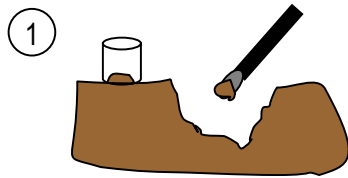


4. Inocular 200µl de cada diluição numa placa de Petri e incubar à temperatura ambiente

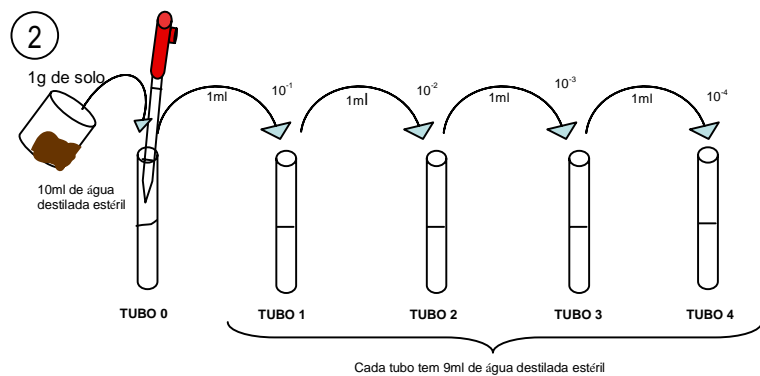
5. Ao fim de 36 horas observar resultados



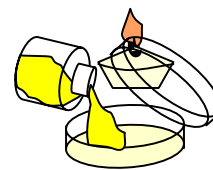
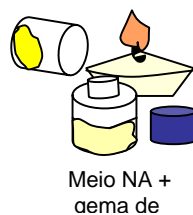
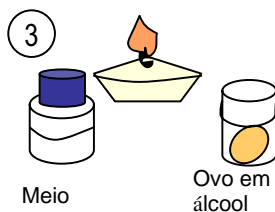
2.2. Detecção da produção de lipases extracelulares por microrganismos do solo



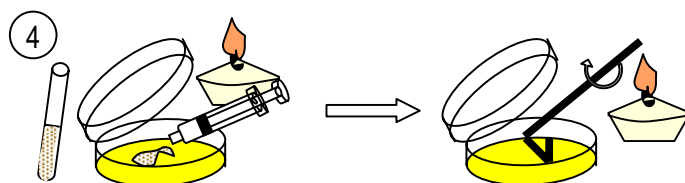
1. Recolher uma amostra de solo.



2. Diluir 1g de solo até ao factor de diluição 10^{-4}

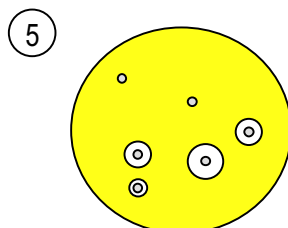


3. Preparar meio de cultura rico em proteínas. Com NA + leite em pó a 10%, autoclavar e dividir por placas de Petri.



4. Inocular 200µl de cada diluição numa placa de Petri e incubar à temperatura ambiente

5. Ao fim de 36 horas observar resultados



Procedimento 3

Determinação do efeito mutagénico da luz ultravioleta em microrganismos do solo

1. Introdução

Em Biotecnologia Microbiana é comum recorrer-se a mutações induzidas para obter melhorias na produtividade de determinado metabolito. A quantidade de metabolitos produzidos pelas estirpes selvagens é geralmente muito baixa devido a mecanismos de autorregulação do metabolismo, o objectivo do melhoramento é aumentar o fluxo metabólico, no sentido da produção do produto desejado.

A luz ultravioleta é tradicionalmente utilizada para provocar mutações nos microrganismos, esta têm a vantagem de conduzir a resultados rápidos e sustentáveis ao longo do tempo, apesar da falta de conhecimento detalhado sobre a fisiologia do microrganismo produtor. As estirpes microbianas podem ser submetidas a tratamentos com fontes de radiação UV, alterando, desta forma, alguma porção do genoma de forma a aumentar a produção de um determinado metabolito, no entanto as mutações podem também diminuir ou inibir a produção.

NOTA: Este procedimento experimental divide-se em 2 partes: a determinação do efeito mutagénico na produção de antibiótico em microrganismos do solo e a determinação do efeito mutagénico na síntese de enzimas extracelulares em microrganismos do solo, efectuada por dois métodos diferentes.

2. Objectivos

- Reconhecer fenómenos de alteração do material genético e a sua utilização na indústria

3. Tempo de execução

Cada procedimento cerca de **45 minutos**.

4. Conhecimentos prévios

- Definição de mutação;
- Definição de antibiótico e enzima;
- Conhecimento das técnicas de assépsia em trabalhos de Microbiologia

Procedimento 3.1

Determinação do efeito mutagénico da luz ultravioleta na produção de antibióticos em microrganismos do solo

1. Material/Reagentes e material biológico

Para procedimento prévio do professor:

Material: 4 placas de Petri e 1 frasco de 100ml por cada aluno ou grupo de alunos, 1 frasco de 200ml, 1 frasco de 100ml.

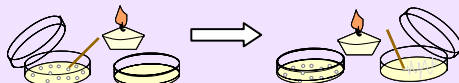
Equipamento: Autoclave ou panela de pressão; Lamparina.

Reagentes e material biológico: 6g de meio NA, 200ml de água destilada; 7,4g de meio NB; Álcool a 95%, cultura de *Micrococcus luteus*, cultura de microorganismo produtor de antibiótico.

Nota: Os microrganismos utilizados devem ser isolados a partir do procedimento 2.

- Procedimento para isolar determinado microrganismo do solo:

Com o auxílio de um palito estéril retirar uma porção da colónia do microrganismo seleccionado a partir da placa teste. Proceder à sua transferência para uma nova placa de Petri com meio NA, utilizando a técnica do riscado por exaustão. Incubar à temperatura ambiente 3 a 4 dias.

**Para procedimento com os alunos:**

Material (por cada aluno ou grupo de alunos): 5 caixa de Petri estéril; 4 seringas estéreis de 1ml ou uma micropipeta P1000; um círculo de cartolina preta; Caneta de acetato; algodão.

Equipamento: Lamparina, cronómetro; Câmara com luz UV (Anexo VIII); estufa.

Reagentes e material biológico: Cultura em meio líquido do microrganismo produtor antibiótico; Cultura em meio líquido de *Micrococcus luteus*; Álcool a 95%.

2. Procedimento do trabalho prévio do professor (36 horas antes):

1. Inocular em 100ml de meio NB uma colónia da cultura do microrganismo produtor de antibiótico e incubar à temperatura ambiente, 36 horas;
2. Inocular em 80 ml de meio NB uma colónia da cultura de *Micrococcus luteus* e incubar na estufa a 36°C durante 36 horas;

MOMENTOS ANTES DA AULA:

1. Preparar o meio de cultura NA, 100ml por aluno ou grupo de alunos;
2. Autoclavar o meio durante 20 minutos a 120° e manter a 45°C (caso o meio solidifique este poderá ser re-aquecido num microondas)

3. Procedimento com os alunos

1. Desinfectar a bancada de trabalho e as mãos com álcool etílico e acender a lamparina. **Atenção** ao álcool pois este é inflamável.
2. Inocular 1ml da cultura de *Micrococcus luteus* no frasco de meio NA, fornecido pelo professor. (Atenção à temperatura do meio a qual não pode ser superior a 45°C);
3. Dividir o meio de cultura incorporado com o *Micrococcus luteus* em 4 placas de Petri, deixar solidificar o meio.
NOTA: a bancada deverá estar nivelada o mais possível para que o meio no interior da placa de Petri possua uma espessura uniforme)
4. Fazer 2 poços em cada placa de meio, com o auxílio do vazador em posições equidistantes, e identificar cada poço com o nome *controlo* ou *teste*.
5. Verter uma porção da cultura na caixa de Petri estéril e com o auxílio de uma seringa estéril colocar 100µl da cultura em cada poço controlo;
6. Colocar a caixa de Petri com a cultura líquida na câmara com luz UV, ligando-a. Iniciar a contagem do tempo.

7. Aos 30 segundos desligar a luz UV e recolher, com o auxílio de uma seringa estéril, 100µl de amostra colocando no poço teste da caixa de Petri correspondente. Ao retirar a amostra irradiada da câmara cobrir a tampa desta com um círculo de cartolina preta, minimizando a ocorrência de mecanismos de reparação genética.
8. Repetir o ponto 5 para os tempos 1', 2'30", 6' e 12'.
9. Incubar as placas de Petri a 37°C durante 36 horas.
10. Observar os resultados.

Procedimento 3.2

Determinação do efeito mutagénico da luz ultravioleta na produção de enzimas extracelulares em microrganismos do solo

1. Material/Reagentes e material biológico

Para procedimento prévio do professor:

Material: 8 placas de Petri por cada aluno ou grupo de alunos; 2 frascos de 200ml.

Equipamento: Autoclave ou panela de pressão; Lamparina.

Reagentes e material biológico: meio NA+leite 10%; meio NA + gema de ovo {**VER PREPARAÇÃO NO PROCEDIMENTO 2**}; 200ml de água destilada; 6g de meio NB; Cultura de microrganismo produtor de proteases extracelulares; Cultura de microrganismo produtor de lipases extracelulares; Álcool a 95%.

Para procedimento com os alunos:

Material (por cada aluno ou grupo de alunos): 1 caixa de Petri estéril; 4 seringas estéreis de 1ml ou uma micropipeta P1000; 1 círculo de cartolina preta, Caneta de acetato; algodão.

Equipamento: Autoclave ou panela de pressão; Lamparina, cronómetro; câmara com luz UV (Anexo VIII)

Reagentes e material biológico: Cultura em meio líquido do microrganismo produtor de proteases extracelulares; cultura em meio líquido do microrganismo produtor de lipases extracelulares; 4 placas de Petri com meio NA + leite 10%; 4 placas de Petri de NA + gema de ovo; Álcool a 95%.

Nota: Os microrganismos utilizados devem ser isolados a partir do procedimento 2.

2. Procedimento do trabalho prévio do professor (36 horas antes):

1. Inocular em 100ml de meio NB uma colónia da cultura do microrganismo produtor de proteases extracelulares;
2. Inocular em 100ml de meio NB uma colónia da cultura do microrganismo produtor de lipases extracelulares;
3. Incubar as duas culturas 36 horas à temperatura ambiente
4. Preparar os meios de cultura, NA + leite 10% e NA + gema de ovo (procedimento 2), autoclavar e distribuir pelas placas de Petri;

3. Procedimento com os alunos

1ª AULA (45 minutos)

1. Desinfectar a bancada de trabalho e as mãos com álcool etílico e acender a lamparina. **Atenção** ao álcool pois este é inflamável.

2. Fazer 2 poços em cada placa de meio, com o auxílio do vazador em posições equidistantes, e identificar cada poço com o nome *controlo* ou *teste*.
3. Verter uma porção da cultura na caixa de Petri estéril e com o auxílio de uma seringa estéril colocar 100µl da cultura em cada poço controlo;
4. Colocar a caixa de Petri com a cultura líquida na câmara com luz UV, ligando-a. Iniciar a contagem do tempo.
5. Aos 30 segundos desligar a luz UV e recolher, com o auxílio de uma seringa estéril, 100µl de amostra colocando no poço teste da caixa de Petri correspondente. Ao retirar a amostra irradiada da câmara cobrir a tampa desta com um círculo de cartolina preta, minimizando a ocorrência de mecanismos de reparação genética.
6. Repetir o ponto 5 para os tempos 1', 2'30", 6' e 12' de cada microrganismo a testar: o microrganismo produtor de proteases e o microrganismo produtor de lipases.
7. Incubar as placas de Petri temperatura ambiente durante 36 horas.
8. Observar os resultados.

Procedimento Opcional

Observação de mecanismos de reparação – a Fotorreactivação

1. Introdução

A **fotorreactivação** é o principal sistema de reparação directa de lesões no DNA dependente de luz natural, sendo a principal defesa de muitos microrganismos contra danos causados por irradiação UV.

2. Objectivos

- Reconhecer fenómenos reparação do material genético

4. Conhecimentos prévios

- Definição de mutação;
- Conhecimento da existência de fenómenos de reparação genética;
- Definição de antibiótico e enzima;
- Conhecimento das técnicas de assépsia em trabalhos de Microbiologia

**Este procedimento deverá ser efectuado em
paralelo com o procedimento 3.2.**

1. Material/Reagentes e material biológico

Para procedimento prévio do professor:

Material: 8 placas de Petri por cada aluno ou grupo de alunos; 2 frascos de 200ml.

Equipamento: Autoclave ou panela de pressão; Lamparina.

Reagentes e material biológico: meio NA+leite 10%; meio NA + gema de ovo {**VER PREPARAÇÃO NO PROCEDIMENTO 2**}; 200ml de água destilada; 6g de meio NB; Cultura de microrganismo produtor de proteases extracelulares; Cultura de microrganismo produtor de lipases extracelulares; Álcool a 95%.

Para procedimento com os alunos:

Material (por cada aluno ou grupo de alunos): 1 caixa de Petri estéril; 4 seringas estéreis de 1ml ou uma micropipeta P1000; Caneta de acetato; algodão.

Equipamento: Autoclave ou panela de pressão; Lamparina, cronómetro; câmara com luz UV (Anexo VIII)

Reagentes e material biológico: Cultura em meio líquido do microrganismo produtor de proteases extracelulares; cultura em meio líquido do microrganismo produtor de lipases extracelulares; 4 placas de Petri com meio NA + leite 10%; 4 placas de Petri de NA + gema de ovo; Álcool a 95%.

Nota: Os microrganismos utilizados devem ser isolados a partir do procedimento 2.

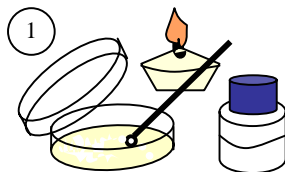
2. Procedimento do trabalho prévio do professor (36 horas antes):

1. Inocular em 100ml de meio NB uma colónia da cultura do microrganismo produtor de proteases extracelulares;
2. Inocular em 100ml de meio NB uma colónia da cultura do microrganismo produtor de lipases extracelulares;
3. Incubar as duas culturas 36 horas à temperatura ambiente
4. Preparar os meios de cultura, NA + leite 10% e NA + gema de ovo (procedimento 2), autoclavar e distribuir pelas placas de Petri;

3. Procedimento com os alunos

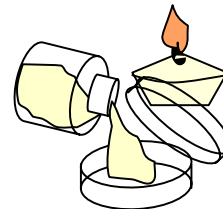
1. Desinfectar a bancada de trabalho e as mãos com álcool etílico e acender a lamparina. **Atenção** ao álcool pois este é inflamável.
2. Fazer 2 poços em cada placa de meio, com o auxílio do vazador em posições equidistantes, e identificar cada poço com o nome controlo ou teste.
3. Verter uma porção da cultura na caixa de Petri estéril e com o auxílio de uma seringa estéril colocar 100µl da cultura em cada poço controlo;
4. Colocar a caixa de Petri com a cultura líquida na câmara ligando a luz UV. Iniciar a contagem do tempo.
5. Aos 30 segundos desligar a luz UV e recolher, com o auxílio de uma seringa estéril, 100µl de amostra colocando no poço teste da caixa de Petri correspondente.
6. Repetir o ponto 5 para os tempos 1', 2'30", 6' e 12' de cada microrganismo a testar: o microrganismo produtor de proteases e o microrganismo produtor de lipases.
7. Incubar as placas de Petri, junto de uma janela ou num local bem iluminado durante 36 horas.
8. Observar os resultados comparando-os com os resultados obtido com o procedimento 3.2.

Nota: Esta experiência poderá também ser realizada com um microrganismo produtor de antibióticos.

Procedimento 3 – passo a passo**Determinação do efeito mutagénico da luz ultravioleta na produção de metabolitos em microrganismos do solo**

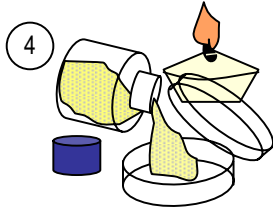
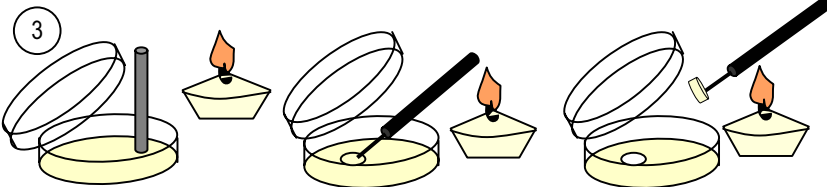
1. Inocular o microrganismo produtor de determinado metabolito em 100ml de meio NB e incubar 36 horas

2

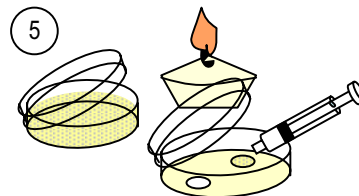


2. Preparar e distribuir em placas de Petri o meio de cultura específico para a detecção da produção do metabolito

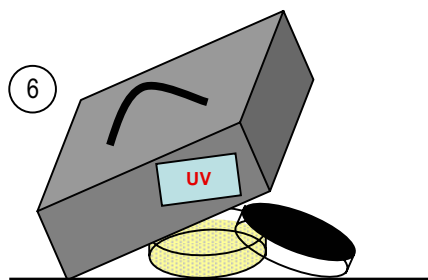
3. Fazer 2 poços em posições equidistantes em cada placa de meio, e identificar cada poço com o nome *controle*.



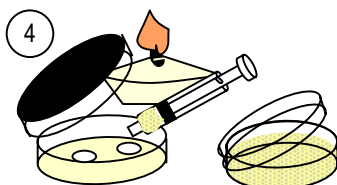
4. Verter uma porção da cultura na caixa de Petri estéril



5. colocar 100µl da cultura em cada poço *controle*



6. Colocar a caixa de Petri com a cultura líquida na câmara ligando a luz UV. Iniciar a contagem do tempo



7. Retirar amostras a diferentes tempos de exposição da cultura à luz ultravioleta e colocar 100µl no poço teste da caixa de Petri correspondente. Proteger da luz natural a amostra radiada com UV. Incubar 36 horas e observar os resultados.

Procedimento 4

Produção de metabolitos microbianos num biorreactor

1. Introdução

Um biorreactor é um equipamento fundamental na Microbiologia industrial, permitindo a produção em grande escala de determinado metabolito com interesse económico. Um biorreactor pode ser utilizado em “Batch”, “Batch alimentado” ou em “Cultivo contínuo”.

Podem ser produzidos diversos metabolitos num biorreactor, desde álcoois, enzimas, antibióticos. Os processos mais utilizados para a produção são o processo de fermentação em contínuo e o processo em “Batch alimentado”.

NOTA: Este procedimento experimental pode ser realizado optando por um sistema de *batch* ou de *batch alimentado*, ou os dois em paralelo. Poder-se-á seguir os mesmos passos para estudar a produção de outro metabolito, variando neste caso o meio de cultura.

2. Objectivos

Simular um processo industrial de produção de enzimas extracelulares, num sistema *batch* e *batch alimentado*.

3. Tempo de execução

20 minutos na fase de início do processo, seguidos de **10 minutos** em cada uma das 6 recolhas amostras ao longo da fase de produção e **20 minutos** para análise dos resultados.

4. Conhecimentos prévios

- Conhecer os princípios básicos de um biorreactor;
- Definição de enzima;
- Conhecimento das técnicas de assépsia em trabalhos de Microbiologia.

5. Material/Reagentes e material biológico

Para procedimento prévio do professor:

Material: 1 frasco de vidro de 200ml, 10 placas de Petri, 1 frasco de vidro de 100ml, Pipetas de 5ml, Papel de alumínio estéril.

Equipamento: Autoclave ou panela de pressão; Lamparina, Biorreactore (Anexo IX).

Reagentes e material biológico: 400ml de meio NB, 150ml de meio NA, Leite e Água destilada; Álcool a 95%.

Para procedimento com os alunos:

Material (por cada grupo de alunos, idealmente 2 grupos): 12 seringas de 5ml estéreis, 6 seringas de 1 ml estéreis, 4 microtubos de 1,5 ml estéreis, 4 Microfiltros de 0,2µm, Vasador (diâmetro de 5mm), Papel de alumínio estéril, 1 pinça, 4 seringas estéreis de 1ml, 1 pipeta de 10ml estéril, pipetador, Caneta de acetato.

Equipamento: Autoclave ou panela de pressão; Lamparina, Biorreactor (anexo IX), Cronómetro.

Reagentes e material biológico: Microrganismo produtor de proteases extracelulares, 5 placas de Petri com meio NA + leite 5%, Álcool etílico a 95%.

Nota: O microrganismo utilizado deve ser isolados a partir do procedimento 2.

6. Procedimento do trabalho prévio do professor:

1. Inocular em 100ml de meio NB uma colónia da cultura do microrganismo produtor de proteases extracelulares;
2. Incubar durante 36 horas à temperatura ambiente

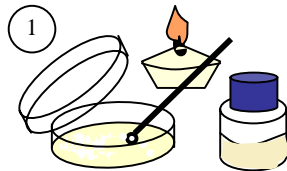
3. Preparar o meio de cultura, NA + leite 5% (procedimento 2), autoclavar durante 20 minutos e distribuir pelas placas de Petri.
4. Introduzir no bioreactor, 150ml de meio NB + leite 5%, isolar a extremidade das pipetas com papel de alumínio e autoclavar durante 20 minutos todo o sistema.
5. Preparar 150 ml de meio NB + leite 5% para stock e autoclavar durante 20 minutos.
6. Colocar o biorreactor na bancada de trabalho e terminar a montagem (Anexo IX).

7. Procedimento com os alunos

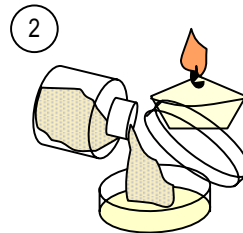
1. Desinfectar a bancada de trabalho e as mãos com álcool etílico e acender a lamparina. **Atenção** ao álcool pois este é inflamável.
2. Fazer 3 poços em cada placa de meio, com o auxílio do vazador em posições equidistantes, e identificar cada poço com o tempo correspondente: tempo 0 (início do processo), tempo 1 (ao fim de 2 horas), tempo 2 (ao fim de 4 horas, tempo 3 (ao fim de 6 horas), tempo 4 (ao fim de 24 horas), tempo 5 (ao fim de 30 horas), reservar.

NOTA: Os tempos podem ser distribuídos ao longo do processo conforme a disponibilidade dos alunos.

3. Inocular com o auxílio da pipeta estéril, 10ml da cultura do microrganismo produtor no frasco de meio NA + leite 5% e no biorreactor, fornecidos pelo professor.
4. Ligar a bomba de ar e ajustar o fluxo de entrada de ar.
5. Com uma seringa estéril retirar 2 ml de amostra do biorreactor, *tempo 0*, filtrar e colocar num microtubo, reservar num frigorífico a 4°C.
6. Repetir o ponto 5 para cada um dos tempos.
7. **No caso de um processo em *batch*:** Observar a alteração na tonalidade do meio de cultura no biorreactor ao longo do tempo e interpretar o resultado.
8. **No caso de um processo em *batch alimentado*:** Com uma seringa estéril realimentar o biorreactor com 2ml de meio stock, fornecido pelo professor, no final da recolha de cada amostra.
9. Com o auxílio de uma seringa estéril de 1 ml colocar 100µl de cada um dos filtrados no poço correspondente das placas de Petri.
10. Incubar à temperatura ambiente durante 36 horas.
11. Observar e interpretar os resultados.

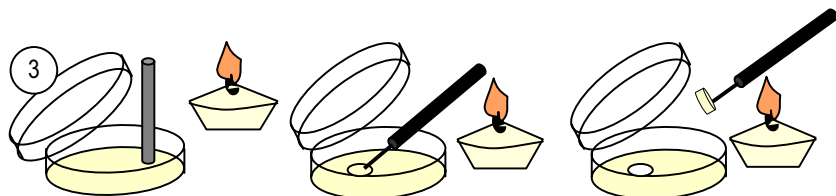
Procedimento 4 – passo a passo**Produção de metabolitos microbianos num biorreactor**

1. Inocular o microrganismo produtor de determinado metabolito em 100ml de meio NB e incubar 36 horas.



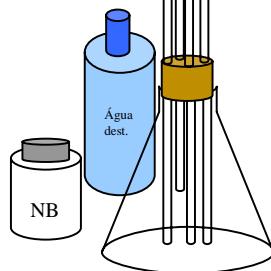
2. Preparar e distribuir em placas de Petri o meio de cultura específico para a detecção da produção do metabolito

3. Fazer 4 poços em posições equidistantes em cada placa de meio, e identificar cada poço com os tempos correspondentes.



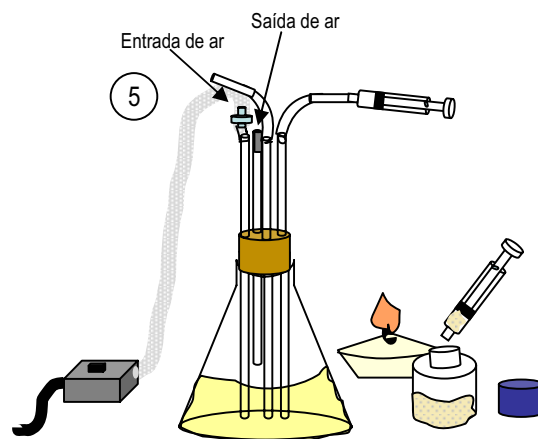
Entrada de meio de cultura, quando em *batch alimentado*.

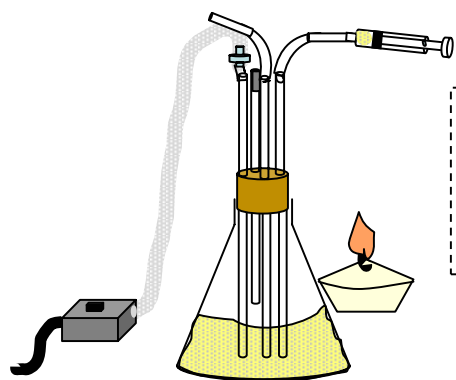
4



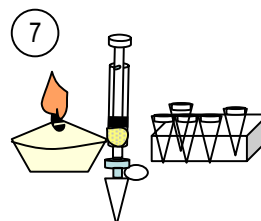
4. Preparar o biorreactor:
- Preparar o meio de cultura;
- Isolar dos tubos com papel de alumínio
- Autoclavar durante 20 minutos a 1 atm.

5. Montar o equipamento de arejamento (filtro, tubo e bomba de aquário). E inocular de 2ml da cultura de microrganismo produtor no biorreactor.
Início do processo de fermentação.

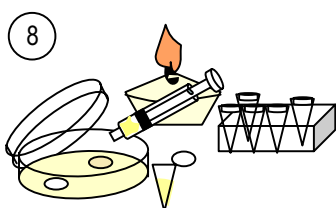




6. Retirar 2ml da amostra a diferentes tempos.

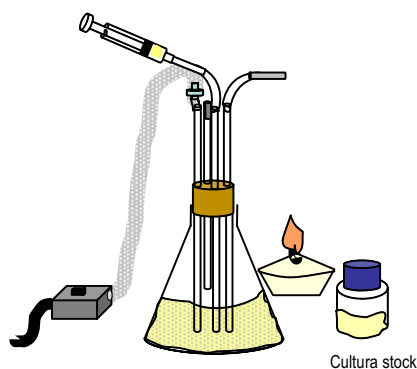


7. Filtragem da amostra para um microtubo e armazenamento num frigorífico.



8. Inoculação de 100µl do filtrado de cada um dos tempos no poço correspondente. Incubação durante 36 horas. Observação dos resultados.

Em *Batch alimentado*, introduzir meio de cultura stock cada vez que se retirar uma amostra do biorreactor.



Procedimento 4

Determinação da actividade enzimática em detergentes domésticos

1. Introdução

Os principais tipos de enzimas utilizadas na indústria de detergentes incluem amilases, que degradam amido e outros carboidratos, as proteases que degradam ligações peptídicas, as lipases, que degradam lipídios, as celulasas que degradam celulose. Na maioria dos detergentes em pó são adicionadas enzimas que vão degradar a matéria orgânica, de acordo com sua afinidade pelo substrato, presente nas manchas das roupas, por exemplo. A principal vantagem da utilização de enzimas nos detergentes é a preservação do ambiente, visto que estas substituem produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos.

2. Objectivos

Reconhecer a utilidade das enzimas no nosso dia-a-dia, determinando a actividade enzimática em detergentes domésticos.

3. Tempo de execução

35 minutos de uma aula distribuídos por dois momentos.

4. Conhecimentos prévios

- Definição de enzimas;
- Conhecimento da função das enzimas;
- Conhecimento das técnicas de assépsia em trabalhos de Microbiologia

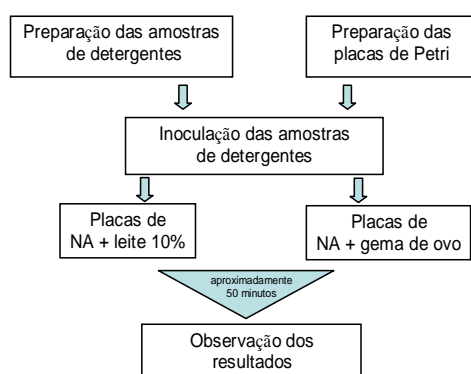


Figura 1: Esquema representativo das etapas experimentais e tempos à temperatura ambiente.

5. Material/Reagentes e material biológico

Para procedimento prévio do professor:

Material: 2 frascos para meio de cultura de 500ml; 1 Copo de vidro de 100ml; 2 Caixas de Petri por cada aluno ou grupo de alunos; 4 tubos de ensaio por cada aluno ou grupo de alunos; 1 suporte para tubos de ensaio; 1 pipeta graduada com 10ml; Algodão; Papel de alumínio.

Equipamento: Balança; Autoclave ou panela de pressão; Lamparina

Reagentes e material biológico: Meio de cultura NA; Água destilada; Álcool étílico 95%; Leite magro em pó; 1 ovo

Para procedimento com os alunos:

Material (por cada aluno ou grupo de alunos): 1 suporte para tubos de ensaio; 4 seringa estéreis de 1ml; 1 colher de sobremesa; Algodão; 1 vazador de diâmetro de 5mm; 1 agulha; 4 fracos de análises clínicas estéreis

Equipamento: Lamparina; Balança

Reagentes e material biológico: 1 placa de Petri com meio NA + leite 10%; 1 placa de Petri com meio NA + gema de ovo; 4 tubos de ensaio com água destilada estéril
álcool etílico a 95%

7. Procedimento prévio do professor:

1. Preparar os meios de cultura:

1.1. Actividade proteolítica: Meio NA + Leite – preparar 100 ml de meio de cultura, com 3g de NA e leite magro a uma concentração final de 10%, autoclavar o meio durante 20 minutos a 120°C, 1atm.

1.2. Actividade lipolítica: Meio NA + gema de ovo – preparar 100ml de meio de cultura, com 3g de NA, autoclavar durante 20 minutos a 120°C, 1atm. e deixar arrefecer o meio até aos 50°C. Esterilizar a superfície de um ovo num copo com álcool etílico a 95% durante 5 minutos. Colocar a gema do ovo no meio de cultura e misturar bem.

2. Dividir os meios em placas de Petri e deixar arrefecer.
3. Preparar 4 tubos de ensaio para cada aluno ou grupo de alunos com 10 ml de água destilada. Autoclavar, durante 20 minutos.

8. Procedimento com os alunos

ESCOLHA DOS DETERGENTES:

1. Observar o rótulo de detergentes domésticos e verificar se possuem enzimas.

Nota: As embalagens dos detergentes nem sempre trazem essa informação. Poderá, no entanto efectuar uma pesquisa na página web oficial da marca do detergente.

2. Recolher amostra de detergentes para frascos de análises clínicas estéril.

1º MOMENTO DE AULA (20 minutos)

1. Desinfectar a bancada de trabalho e as mãos com álcool etílico e acender a lamparina. **Atenção** o álcool é inflamável.
2. Fazer 4 poços na placa de meio, com o auxílio do vazador em posições equidistantes, e identificar cada poço com o nome do detergente a testar.
3. Pesar 1g de detergente e colocá-la num tubo de ensaio identificando-o, repetir para cada amostra de detergente. Agitar a solução.
4. Com uma seringa estéril colocar 100µl de amostra de detergente num dos poços da placa de Petri com NA + leite 10%. E repetir o mesmo procedimento para a placa de NA com gema de ovo.
5. Repetir o ponto 5 para as restantes amostras de detergente.
6. Reservar as placas de Petri durante aproximadamente 40 minutos à temperatura ambiente.

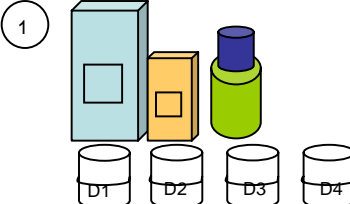
2º MOMENTO DE AULA (15 minutos)

1. Observar e interpretar os resultados.

Procedimento 4 – passo a passo

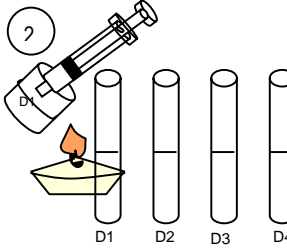
4. Determinação da actividade enzimática em detergentes domésticos

1



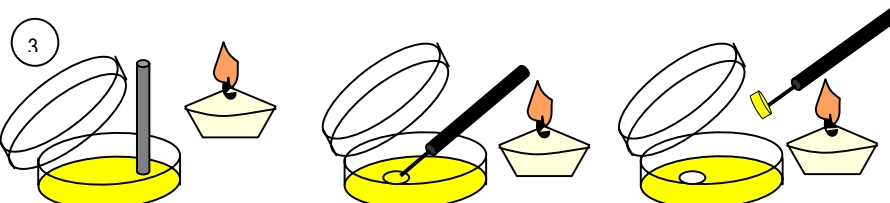
1. Seleccionar os detergentes com enzimas na sua constituição

2



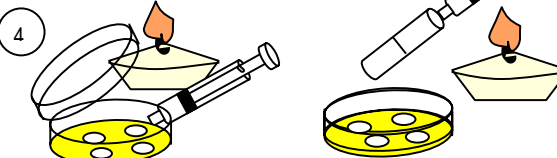
2. Diluir 1g de detergente em 10 ml de água destilada estéril

3



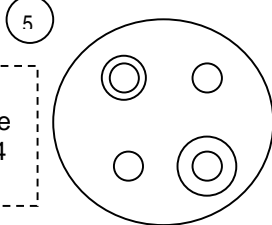
3. Fazer 4 furos no meio de cultura com o vazador, nas placas de meio NA+leite 10% e nas placas de meio NA+gema de ovo

4

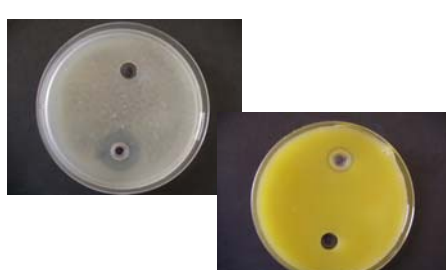


4. Colocar 100µl das amostras de detergente em cada poço.

5



5. Observar os resultados ao fim de aproximadamente 4 horas.



A

ctinomicetes



São um grupo de bactérias Gram positivas filamentosas. A maioria dos actinomicetes forma esporos, embora a forma de esporulação varie nas diferentes espécies (Madigan *et al*, 2000).

A composição de bases de DNA da maioria dos membros dos actinomicetes enquadra-se na faixa de 63-78% de GC (Madigan *et al*, 2000; Ballows *et al*, 1992).

Os filamentos vegetativos possuem um diâmetro entre 0.5-2.0 μm , uma temperatura ótima entre 25 a 35 $^{\circ}\text{C}$ e pH ótimo entre 6,5 a 8. Usualmente as colónias são brancas, acinzentadas a amarelas pálidas (Ballows *et al*, 1992).

As propriedades de formação de micélio e esporos têm importância tanto filogenética como taxonómica. A diversidade do grupo é observada na produção de enzimas extracelulares e de muitos outros tipos de metabolitos que sintetizam e excretam. Muitos destes produtos são antibióticos (Ballows *et al*, 1992).

Habitat

O principal nicho ecológico é provavelmente as zonas aeróbicas do solo, onde vivem saprofiticamente à custa de uma vasta gama de substâncias orgânicas. No solo o seu número excede 1 milhão/g de solo.

A capacidade de produzir enzimas extracelulares que degradam macromoléculas complexas que se encontram no solo torna-os num grupo com grande vantagem competitiva no seu habitat (McCarthy, 1989 *in* Ballows *et al*, 1992).

A formação de esporos propriedade que permite a estes organismos uma elevada resistência à dissecação aumenta a sua sobrevivência em solos frequentemente secos, como é o caso dos *Streptomyces*.

A característica formação de filamentos e esporos pode ser considerada uma estratégia para a resistência a factores adversos, defesa contra predadores e dispersão da espécie (Ballows *et al*, 1992).

Isolamento e identificação

A adição de antibiótico antifúngico, tal como, é o exemplo a cicloheximida que elimina os fungos é uma técnica que permite o isolamento de espécie deste grupo.

Outra técnica é a secagem da amostra de solo à temperatura ambiente ou a elevadas temperaturas, a qual leva à morte de uma grande quantidade de bactérias menos resistentes particularmente as Gram negativas, enquanto que as mais resistentes à dissecação sobrevivem.



Figura 1: Aspecto característicos dos actinomicetes em placa de Petri com meio NA.

Streptomyces – género do grupo dos actinomicetes, representado por um grande número de espécies e variedades. A aparência de pó de giz das colónias maduras, a sua natureza compacta e coloração tornam-no relativamente simples de identificar em placas de meio sólido (figura 1)

Ecologia e isolamento de *Streptomyces*

Embora alguns *Streptomyces* possam ser encontrados em habitats aquáticos, este correspondem, primordialmente, a organismos do solo. Uma característica deste género é o odor a terra molhada decorrente da produção de geosmina (Madigan *et al*, 2000).

Os solos alcalinos e neutros são mais favoráveis ao desenvolvimento dos *Streptomyces* que os solos ácidos. Um maior número pode ser encontrado em solos bem drenados. Este género requer para o seu crescimento um potencial de água menor que várias outras bactérias do solo (Ballows *et al*, 1992).

Para isolar *Streptomyces* poder-se-á proceder à diluição de uma suspensão de solo em água estéril a qual é semeada num meio de cultura sólido selectivo, sendo a incubação realizada a 25 $^{\circ}\text{C}$.

A maioria de isolados de *Streptomyces* produz enzimas hidrolíticas extracelulares permitindo-lhe a utilização de polissacarídeos (amido, celulose, hemicelulose), proteínas e gorduras.

A propriedade mais notável dos *Streptomyces* corresponde à intensa produção de antibióticos. Em diversos estudos, cerca de 50% de todos os *Streptomyces* isolados demonstraram ser produtores de antibióticos (Madigan *et al*, 2000). A razão ecológica para a produção de antibióticos não é muito clara. No entanto, existem hipóteses que a ligam à esporulação, correspondendo a um mecanismo que visa inibir o crescimento de outros organismos, os quais competiriam pelos nutrientes limitados com as células de *Streptomyces* em diferenciação. A produção de antibióticos permite assim, aos *Streptomyces* completarem a esporulação, formando uma estrutura dormente mais resistente (Madigan *et al*, 2000).

Bacillus

São um género bactérias Gram positivas, aeróbico ou anaeróbico facultativo. As taxas de GC nas espécies de *Bacillus* varia em torno dos 40%.

Com dimensões entre 0.3-2.2 por 1.2-7.0 µm. As colónias são usualmente brancas, creme a amarelas (Balows *et al*, 1992).

Muitos *Bacillus* produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que degradam polímeros complexos. Vários produzem antibióticos, produção esta, que na maioria dos casos, está relacionada ao processo de esporulação, sendo o antibiótico libertado quando a cultura entra na fase estacionária de crescimento no início do processo de esporulação (Madigam *et al*, 2000).

A heterogeneidade na fisiologia, ecologia e na genética torna este género difícil de categorizar ou de fazer generalizações (Ballows *et al*, 1992).

Habitat

A distribuição dos esporos dormente pode explicar a ocorrência das espécies de *Bacillus* em muitos habitats, como é o caso do solo.



Figura 2: Aspecto de uma cultura em placa com NA de *Bacillus cereus*.

Micrococcus

Género de bactérias Gram positivas, de ocorrência esférica em pares, em tetradas ou irregulares, usualmente sem mobilidade. Não havendo neste género nenhum membro com formação de esporos. Usualmente aeróbicos. Em que muitas espécies possuem pigmentos carotenóides (Balows *et al*, 1992).

As colónias são geralmente amarelas ou vermelhas de dimensões que variam de 0.5-2.0µm de diâmetro. Têm geralmente uma temperatura óptima de crescimento entre 25 a 37° C.

Espécies como o *Micrococcus luteus* e *Micrococcus varians* são muito utilizadas na indústria como microrganismos ensaio para efectuar vários testes.

Habitat

A pele humana é considerado o principal habitat dos micrococos. Do total da população de microrganismo da pele humana 96% são micrococos sendo que 90% destes são da espécie *Micrococcus luteus* (Ballows *et al*, 1992).

A população de *Micrococcus luteus* é usualmente isolada a partir da pele humana, no entanto outras espécies podem ser isolada a partir de peles de outros mamíferos.

No solo o *Micrococcus luteus* morre relativamente rápido pois é destruído por outras bactérias com facilidade.

Isolamento

O isolamento é efectuado directamente a partir da pele humana, sendo posteriormente usados meios selectivos para eliminar *Bacillus* e *Staphylococcus* também frequentes na pele.

Muitos micrococcus crescem em meio NA ou P agar a 37°C. E podem ser conservados em NA a 5°C durante 3 a 5 meses se estiverem em caixas perfeitamente seladas.



Figura 3: Aspecto de uma cultura em placa com NA de *Micrococcus luteus*.

Construção de uma câmara de luz UV

Material:

- 1 caixa de sapatos
- 1 lâmpada germicida de UV
- 2 suportes para a lâmpada
- 1 balastro 220V
- 1 arrancador e suporte
- 1 ficha
- 1 interruptor
- 1 ligador duplo
- 2 metros de cabo eléctrico duplo
- 1 metro de cabo eléctrico
- Fita adesiva isoladora 6000V
- Papel autocolante
- 1 chave de fendas
- 1 alicate

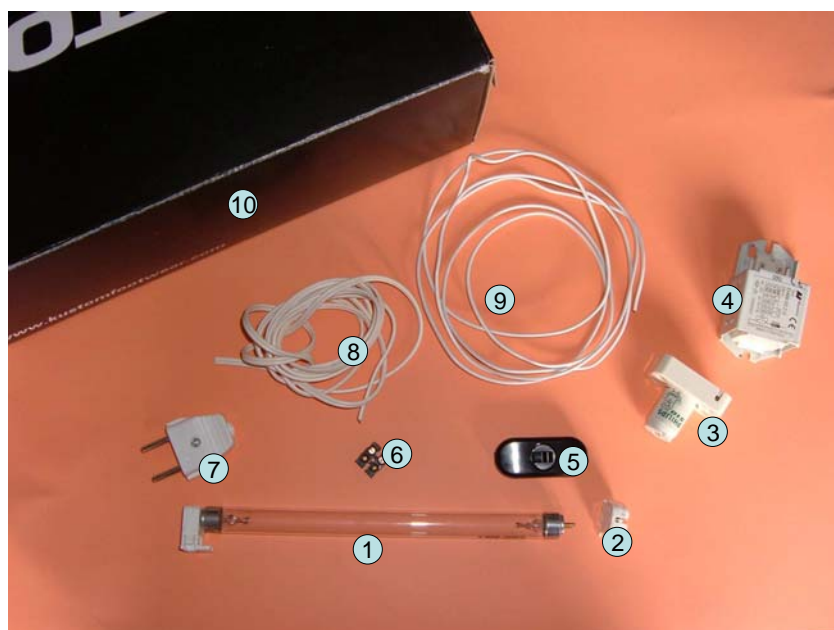


Figura 1: Fotografia do material necessário: Lâmpada de UV (1), Suporte para lâmpada (2), Arrancador (3), Balastro (4), Interruptor (5), Ligador duplo (6), Ficha (7), Fios eléctricos (8) e (9), Caixa (10).

Procedimento:

- 1- Reunir todo o material necessário para a montagem.
- 2- Tendo em atenção os seguintes esquemas exemplificativos proceder à montagem de cada uma das peças.

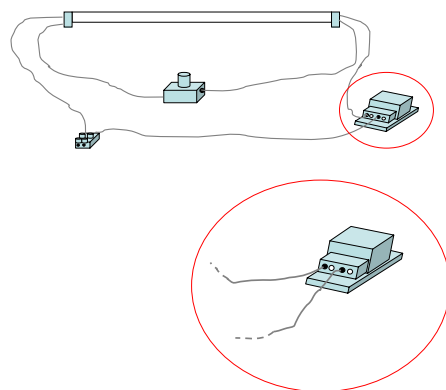


Figura 2: Esquema exemplificativo da montagem do balastro. Em pormenor locais de ligação.

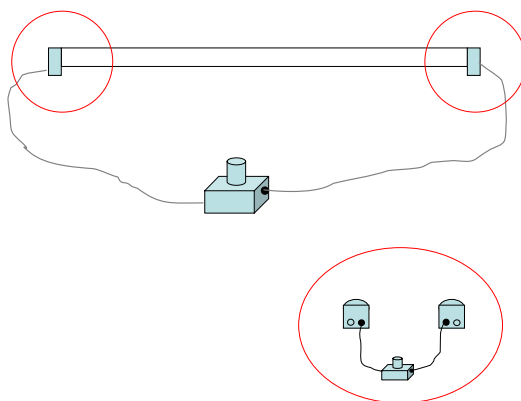


Figura 3: Esquema exemplificativo da montagem do arrancador aos suportes para a lâmpada. Em pormenor locais de ligação do fio eléctrico aos suportes.

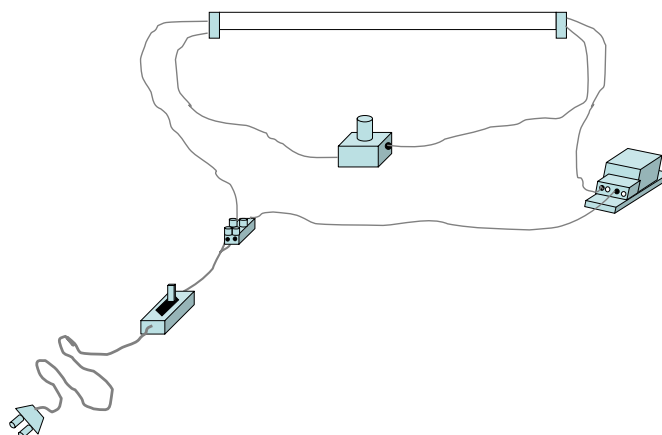


Figura 4: Esquema exemplificativo de todo o sistema eléctrico.



Figura 5: Fotografia do sistema eléctrico

3- Terminada a montagem eléctrica colocar todo o circuito no interior da caixa. Tal como se pode observar na figura 6.



Figura 6: Fotografia do sistema eléctrico no interior da caixa.

4- Fazer um pequeno orifício num dos vértices da caixa e passar o fio eléctrico duplo. Proceder seguidamente à montagem da ficha na extremidade do fio eléctrico.

5- Fixar com a fita isoladora todo o sistema à caixa, não esquecendo de tapar o orifício por onde passa o fio eléctrico (figura 7).

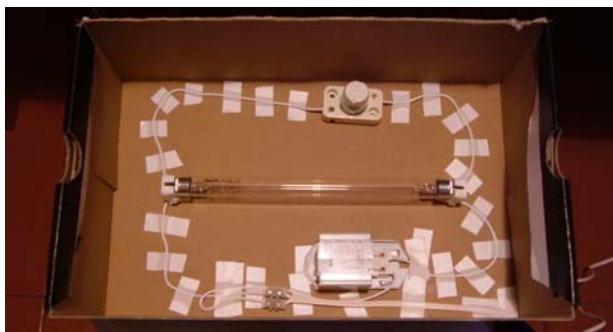


Figura 7: Fotografia do sistema eléctrico fixo à caixa.

6- A câmara com luz UV está pronto a utilizar. Poderá no final furar a caixa e colocar uma legenda na caixa e no interruptor (figura 8)

ORÇAMENTO → Tabela de preços:

Artigo/Equipamento	Preço aproximados em euros c/ IVA*
Lâmpada de UV germicida	11,50
Balastro	2,99
Arrancador	0,43
Suporte de arrancador	0,79
2 Suportes para lâmpada	1,00
Ficha	0,50
Interruptor	1,05
Ligador duplo	0,10
Cabo	0,55
Cabo	0,29
Fita adesiva isoladora	1,00
TOTAL	20,20

* IVA a 21%

Construção de um biorreator

Material:

- 1 erlenmayer de 500 ml
- 1 rolha de plástico ou silicone
- 2 pipetas de 1ml
- 2 pipetas de 2ml
- 20 cm de tubo transparente de aproximadamente 0,6cm de diâmetro
- 1 bomba de aquário
- 1 microfiltro estéril de 0,2 μm
- seringas estéril de 5 ml
- papel de alumínio
- algodão cardado
- 1 cortador de vidro

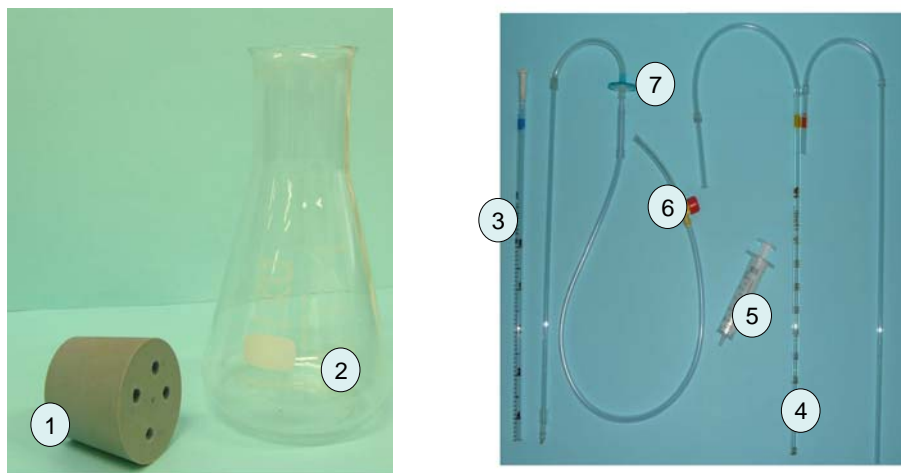


Figura 1: Registo fotográfico do material necessário: rolha (1), erlenmayer 500ml (2), pipeta de 2ml (3), pipeta de 1ml (4), seringa de 1ml (5), tubo de plástico (6), filtro(7).

Procedimento:

- 1- Reunir todo o material necessário para a montagem.
- 2- Congelar a rolha de plástico e fazer nesta quatro furos com o diâmetro das pipetas utilizadas, com o auxílio de um berbequim.
- 3- Com o auxílio cortador de vidro, cortar as pontas das pipetas.
- 4- Colocar as pipetas nos respectivos furos e na extremidade exterior dos tubos de entrada de ar, entrada de meio, e saída de amostras, adicionar os tubos de silicone. Utilize as pipetas de 1ml para a entrada meio e saída de amostras.

Nota: se os tubos não forem de silicone a esterilização destes terá que ser feita mergulhando-os cerca de 30 minutos num recipiente com álcool 98%, visto que este não resiste às elevadas temperaturas do autoclave.

5- A pipeta correspondente à saída de ar tem que ficar acima do nível do meio que se adicionar no erlenmayer. Na extremidade exterior desta adiciona-se uma porção de algodão cardado, que irá evitar possíveis contaminações.

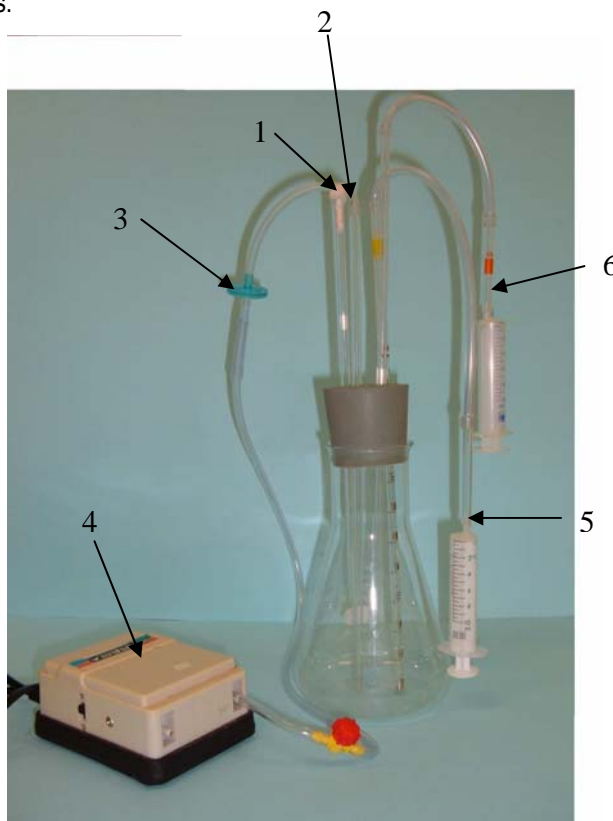


Figura 2: Registo fotográfico do biorreator. Em 1) saída de ar (com algodão cardado), 2) entrada de ar, 3) microfiltro para esterilização do ar bombeado, 4) bomba de aquário, 5) saída da amostra, 6) entrada de meio.

6- Opcional: colocar uma torneira ou uma prensa junto à bomba de aquário de forma a controlar o fluxo de ar que segue para o erlenmayer.

7- Montado o biorreator adicionar o meio pretendido e autoclavar todo o sistema.

8- No fim da esterilização adicionar na extremidade da entrada de ar um microfiltro estéril (figura 2) e ligar este à bomba de aquário.

ORÇAMENTO → Tabela de preços:

Artigo/Equipamento*	Preço em euros c/ IVA*
Erlenmayer 500ml	3,66
1 rolha de plástico nº13	3,55
2 pipetas de 1ml, graduação 1/100	2,86
2 pipetas de 2ml, graduação 1/50	2,86
20 cm de tubo transparente Ø 0,6cm (Látex ou Silicone)	0,36 ou 0,60
1 bomba de aquário – silenciosa, caudal 120l/h, 220V	17,10
1 Microfiltro estéril de 0,2µm	0,93
2 Seringas estéreis de 5ml	0,50
Papel de alumínio 20 m	1,75
Algodão cardado 100g	0,87
Cortador de vidro	16,50
TOTAL	50,94 ou 51,18

* IVA a 21%